

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С  
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
Международное бюро



(43) Дата международной публикации:  
27 января 2005 (27.01.2005)

РСТ

(10) Номер международной публикации:  
WO 2005/007187 A1

(51) Международная патентная классификация<sup>7</sup>:  
A61K 38/43, 31/7088, 39/395, A61M 1/36, G01N 33/68,  
A61P 35/00, 31/00

(74) Агент: САНДИГУРСКИЙ Олег Львович; 191040  
Санкт-Петербург, а/я 40 (RU) [SANDIGURSKY,  
Oleg Lvovich, St. Petersburg (RU)].

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2003/000304

(81) Указанные государства (национально): AU, BR,  
CA, CN, CU, HR, HU, IL, IN, JP, KR, RU, SK, US,  
YU.

(22) Дата международной подачи:  
14 июля 2003 (14.07.2003)

(84) Указанные государства (регионально) евразийский  
патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(71) Заявители и

(72) Изобретатели: ТЕЦ Виктор Вениаминович  
[RU/RU]; 196066 Санкт-Петербург, ул. Ленсовета,  
д. 27, кв.95 (RU) [TETS, Viktor Veniaminovich,  
St.Petersburg (RU)]; ГЕНКИН Дмитрий Дмитрие-  
вич [RU/RU]; 197000 Санкт-Петербург, Константи-  
новский пр., д. 26, кв.2 (RU) [GENKIN, Dmitry  
Dmitrievich, St.Petersburg (RU)].

Опубликована

С отчетом о международном поиске.

(72) Изобретатель; и

(75) Изобретатель/Заявитель (только для (US): ТЕЦ  
Георгий Викторович [RU/RU]; 191025 Санкт-  
Петербург, ул. Пушкинская, д. 13, кв. 41 (RU)  
[TETS, Georgy Viktorovich, St.Petersburg (RU)].

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и дру-  
гих сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям»,  
публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюл-  
летеня РСТ.

(54) Title: METHOD FOR TREATING ONCOLOGICAL, VIRULENT AND SOMATIC DISEASES, METHOD FOR  
CONTROLLING TREATMENT EFFICIENCY, PHARMACEUTICAL AGENTS AND COMPOSITION FOR CARRYING  
OUT SAID TREATMENT

(54) Название изобретения: СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ИНФЕКЦИОННЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И  
КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

(57) Abstract: The invention relates to medicine and veterinary science and discloses a novel method for treating oncological,  
virulent and somatic diseases whose main target for therapeutic action is embodied in the form of DNA which freely circulates  
in blood plasma (and other liquid media) and originates from tumoral and mutant cells or cells infected by bacteria, fungi or  
protozoan and from different microorganisms which reside in the organism thereof. Said invention also relates to novel  
pharmaceutical compositions and to the use thereof for treating oncological diseases and infectious states provoked by bacteria,  
fungi and protozoa and non-infectious somatic diseases and states produced by accumulation of somatic mutations in cells of  
organism. Medicinal and immunological compositions, sorption and physico-chemical engineering and the method for using  
them in order to treat malignant tumors and other diseases are also disclosed.

[Продолжение на след. странице]

WO 2005/007187 A1



---

(57) **Реферат:** Изобретение относится к медицине и ветеринарии и раскрывает новый способ лечения онкологических, инфекционных и неинфекционных заболеваний, при котором главной мишенью терапевтического воздействия является свободно циркулирующая в плазме крови (и других жидких средах) ДНК, происходящая из находящихся в его организме опухолевых, мутантных, или инфицированных бактериями, грибами, простейшими клеток, а также из различных микроорганизмов. Описаны новые фармацевтические композиции и методы их применения для лечения онкологических заболеваний, инфекционных состояний, вызванных бактериями, грибами и простейшими, а так же неинфекционных соматических заболеваний и состояний, связанных с накоплением соматических мутаций клетках организма. Изобретение описывает лекарственные и иммунологические композиции, а также сорбционные и физико-химические технологии и способы их применения для лечения злокачественных опухолей и других заболеваний.

IP20 Rec'd PCT/PTO 12 JAN 2006

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, ИНФЕКЦИОННЫХ И  
СОМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И  
5 КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

Область техники

Изобретение относится к медицине и ветеринарии и раскрывает  
новый способ лечения онкологических, инфекционных и  
неинфекционных заболеваний, при котором главной мишенью  
10 терапевтического воздействия является свободно циркулирующая в  
плазме крови (и других жидких средах) больного ДНК, происходящая из  
находящихся в его организме опухолевых, мутантных, или  
инфицированных бактериями, грибами, простейшими клеток, а также из  
различных микроорганизмов. Описаны новые фармацевтические  
15 композиции и методы их применения для лечения онкологических  
заболеваний, инфекционных состояний, вызванных бактериями, грибами  
и простейшими, а так же неинфекционных соматических заболеваний и  
состояний, связанных с накоплением соматических в клетках организма.  
Изобретение описывает лекарственные и иммунологические  
20 композиции, а также сорбционные и физико-химические технологии и  
способы их применения для лечения злокачественных опухолей и  
профилактики их рецидива, а так же лечения инфекций, атеросклероза,  
диабета и для замедления процесса старения. Предложенный способ  
отличается новым принципом действия, повышенной эффективностью  
25 противоопухолевого и противомикробного воздействия и может найти  
применение в терапии онкологических заболеваний, различных  
инфекций и неинфекционных соматических заболеваний.

Предшествующий уровень техники

Популяции опухолевых клеток, развивающиеся в организме больного,  
30 обладают чрезвычайно высокой степенью генетической

изменчивости, намного превышающей таковую у здоровых клеток. Генетическая изменчивость популяций опухолевых клеток позволяет им в процессе заболевания генерировать фенотипы, нечувствительные к иммунному и морфогенетическому контролю, способные к инвазии и метастазированию и нечувствительные к противоопухолевой терапии. Считается, что селекционный отбор и клональная экспансия опухолевых клеток лежат в основе биологической и клинической “прогрессии” опухолей. В соответствии с этими представлениями, стратегия современной противоопухолевой терапии основана на принципе уничтожения клонов опухолевых клеток в организме больного с помощью методов – химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, хирургического удаления и различных их комбинаций. Все эти методы имеют одну общую фундаментальную особенность – конечной терапевтической мишенью воздействия является опухолевая клетка. Опыт подобной терапии свидетельствует, что вследствие высокой генетической изменчивости опухолевые клетки в основном приобретают нечувствительность к применяемой терапии до того, как используемая методика позволяет их полностью уничтожить.

Существует значительная потребность в новых противоопухолевых лекарствах, менее токсичных, чем большинство из ныне известных. Также имеется потребность в новых противоопухолевых препаратах, которые могут быть использованы для повышения эффективности ныне известных методов. Аналогично, существует значительная потребность в новых противоопухолевых лекарствах, которые могут быть использованы для снижения токсичности ныне известных методов лечения без уменьшения их эффективности.

Циркуляция молекул ДНК в плазме крови больных онкологическими заболеваниями и здоровых людей описана в ряде работ (P.Anker et al. , Clinica Chimica Acta ,v.313, 2001, pp143-146; Fedorov N.A.

et.al., Bull.Exp.Biol.Med.,v102,1986, pp281-283). Патент (US 5952170) описывает определение ДНК в плазме крови для диагностики и прогнозирования течения онкологических заболеваний Патенты (US 6465177 и US 6156504) описывают использование ДНК плазмы крови  
5 для определения мутаций в онкогенах и микросателлитных участках генов, изучения геномной нестабильности в опухолях и использования результатов наблюдений для диагностики, мониторингирования и прогнозирования течения заболевания.

Sugihara S . et al.(1990, 1993) изучали влияние ферментов альфа  
10 химотрипсина и дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I) на аутологичную и гетерологичную адгезию опухолевых клеток при метастазировании. Ими показано, что системное введение ДНКазы I приводит к замедлению роста метастазов. Однако выявленный эффект оказался недостаточным. Авторы делают вывод, что ДНКазы I может быть использована вместе с  
15 хирургическим удалением опухоли для предотвращения гематогенного метастазирования. Идея авторов заключалась в воздействии на цитоплазматическую мембрану опухолевых клеток и не включала разрушения свободно циркулирующей ДНК. Используемые режим и дозы не могли вызвать продолжительного снижения уровня  
20 циркулирующей ДНК.

Torchilin V.P. (2001), Патент US 5,780,033, заявляет использование аутоантител, способных связываться с цитоплазматическими и ядерными мембранами опухолевых клеток, и с протеин-ДНК комплексом, происходящим из мертвых опухолевых  
25 клеток. Из текста заявки видно, что речь идет именно об антителах против белковых антигенных детерминант. В нашем случае используются анти-ДНК антитела и анти-ДНК абзимы. Кроме того, заявленная авторами терапия направлена против фагоцитоза нуклеосом на поверхности опухолевых клеток, что исключает формирование

адекватных терапевтических режимов, необходимых для связывания и выведения из циркуляции ДНК, находящейся в плазме.

Практически нет данных о циркуляции в крови бактериальной ДНК. В организме человека все микробы существуют в составе сообществ-биопленок (Davey M.E. O'toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to Molecular genetics. Microbiol. Mol.Genet. 64:847-867). Биопленки образованы микробными клетками, объединенными с помощью внеклеточного матрикса (Tetz V.V. 1999. Formation and structure of mixed bacterial communities. APMIS, 107:645-654). В составе матрикса биопленок нами обнаружена внеклеточная ДНК, попадающая туда из живых клеток. Наши данные свидетельствуют также, что бактериальная ДНК присутствует в плазме крови инфицированного человека, а её количество и состав могут изменяться при развитии определенных инфекций. Известно, что ДНК может попадать в окружающую среду также при гибели клеток, например в очаге воспаления. При этом, будучи полимером, ДНК значительно повышает вязкость материала (секрета), что негативно сказывается на течении заболевания, затрудняет удаление патогенов, токсинов, разрушенных клеток и.т.д. Известен лечебный препарат (Gentech –Roch) “Pulmosime”, представляющий собой альфа-ДНК-азу, которая вводится ингаляционно, при лечении муковисцидоза. Эффект действия связан с местным разжижением секрета и не имеет отношения к нарушению транспорта генетической информации этими молекулами ДНК.

Систематический анализ спектра ДНК из крови людей и животных отсутствует. Данные исследований ДНК плазмы крови без проведения ПЦР в печати не обнаружены. Использование ПЦР может сильно исказить состав ДНК плазмы в силу специфичности праймеров, применяемых для амплификации. В связи с этим до последнего времени генетический анализ ДНК плазмы, проводился в основном при помощи

ПЦР или блот-гибридизации, и был направлен на изучение изменений в определённых участках генома (например в микростателлитах и отдельных генах) при опухолевом процессе ( Sanchez-Cespedes M., et al., Ann Oncol, 1998, v9(1), pp113-116; Sozzi G., et al., Clin Can Res, 1999, v5(10), pp2689-2692; Chen X.Q., et al., Nat Med, 1996, v2(9), pp1033-1035).

Таким образом, отсутствуют знания о генетическом репертуаре ДНК, циркулирующей в плазме крови больных при онкопатологии, инфекциях, соматической патологии и у здоровых людей, ее биологической роли и возможном терапевтическом эффекте ее уничтожения или инактивации для лечения этих заболеваний.

#### Раскрытие изобретения

В результате работы над изобретением неожиданно было обнаружено, что ДНК, свободно циркулирующая в плазме крови онкологических больных, содержит уникальный по своему качественному и количественному составу репертуар генов и регуляторных генетических элементов, резко отличающийся от репертуара ДНК, описанного в геноме человека. ДНК плазмы крови онкологических больных содержит в основном уникальные гены человека, включая гены, ассоциированные с поддержанием и формированием «злокачественного» фенотипа. Показано, что ДНК плазмы крови онкологических больных участвует в межклеточном переносе генетической информации внутри популяции опухолевых клеток в организме больного. Настоящее изобретение раскрывает методы уничтожения или инактивации свободно циркулирующей в плазме ДНК, что приводит к подавлению развития раковой опухоли в организме. Изобретение так же включает в себя метод идентификации новых геномных последовательностей, вовлеченных в прогрессию опухолей и в функционирование генома человека. Этот аспект изобретения связан с

выделением, клонированием и сиквенированием образцов ДНК из плазмы крови онкологических больных и здоровых людей.

Обнаружено, что различные бактерии выделяют ДНК в матрикс биопленок, и она попадает в кровь и тканевую жидкость в организме человека и животных. Установлено, что наличие внеклеточной ДНК является одним из условий развития микробной инфекции.

Изобретение включает в себя уничтожение и(или) инактивацию циркулирующей микробной ДНК как метода лечения и профилактики, вызываемых ими заболеваний.

10 Также было обнаружено, что ДНК циркулирующая в крови здоровых людей играет существенную роль в развитии соматического мозаицизма, а ее связывание, разрушение или инактивация подавляют развитие соматического мозаицизма. Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующей в плазме крови дает леченый эффект при  
15 заболеваниях, связанных с развитием соматического мозаицизма

Один аспект изобретения раскрывает фармацевтические композиции и нефармацевтические методы уничтожения или инактивации свободно циркулирующей ДНК в плазме крови больных при онкопатологии и инфекциях.

20 Другой аспект изобретения раскрывает способ лечения больных при онкопатологии, инфекциях, соматических заболеваниях и для продления жизни, связанный с введением им фармацевтических композиций или применением нефармацевтических методов, приводящих к уничтожению или инактивации свободно циркулирующей  
25 в плазме ДНК.

Еще один аспект изобретения раскрывает способ контроля эффективности лечения, направленного на уничтожение или инактивацию свободно циркулирующей в плазме ДНК, включающий мониторинг содержания ДНК в плазме крови и определение



наличия в ней опухолеспецифических или микробных генетических маркеров.

Описаны также способы лечения больных при онкопатологии и инфекциях, связанные с введением им фармацевтических композиций  
5 или применением нефармацевтических методов, приводящих к уничтожению или инаktivации свободно циркулирующей в плазме ДНК, когда подобное лечение сочетается с применением стандартных методов противоопухолевой или противомикробной терапии.

Генетическая изменчивость раковых клеток, позволяющая  
10 популяции раковых клеток быстро накапливать и поддерживать признаки, формирующие злокачественный «фенотип», проявляется на генном и хромосомном уровнях потерей, приобретением или изменением последовательностей ДНК – от единичных нуклеотидов до целых хромосом. (Loeb K.R. et.al., Carcinogenesis, v21,2000,pp.379-385).  
15 Источником подобной изменчивости считается особый *modus operandi* генетического аппарата раковой клетки - значительно повышенная частота спонтанной мутационной изменчивости на фоне сниженной активности репарационных механизмов и отключения систем контроля генетического гомеостаза (Schmutte C., et al., Anticancer Res., 1999, v19, pp.4665-4696).  
20 Считается, что «мутаторный» фенотип раковых клеток (Loeb L.A., Cancer Research, 2001, v61, pp.3230-3239), свойственная клонам раковых клеток динамическая гетерогенность (Heppner G.H. et al., International Review of Cytology, 1998, v177, pp.1-56) и многочисленные повторяющиеся раунды селекции раковых клонов в процессе прогрессии  
25 опухоли (Cahill D.P. et al., Trends in Cell Biology, v9, pp.M57-M60 ; Rubin H., Adv Cancer Res, 2001, v83, pp.159-207; P. Nowell, Seminars in Cancer Biology, v 12, 2002, pp.261-266) приводят в конечном итоге к селекции и последующей экспансии наиболее злокачественного ракового клона. В соответствии с этими имеющимися знаниями современные методы

лечения злокачественных новообразований построены на принципе уничтожения опухолевых клеток в организме больного.

В процессе исследований было неожиданно обнаружено, что накопление генетических изменений, необходимых для формирования  
5 «злокачественного фенотипа» клинически продвинутой раковой опухоли является следствием кооперативного межклонального взаимодействия внутри популяции раковых клеток в организме больного, связанного с горизонтальным переносом генетической информации.

Мессенджером подобного кооперативного взаимодействия  
10 является свободно циркулирующая в плазме крови опухолевых больных ДНК, осуществляющая внутрипопуляционный межклональный перенос генов, участвующих в формировании «злокачественного фенотипа» популяции.

Разрушение или инактивация свободно циркулирующей в плазме  
15 ДНК приведет к тому, что популяция опухолевых клеток в организме не может поддерживать необходимый уровень генетической изменчивости и теряет способность поддерживать «злокачественный фенотип» (рост, метастазирование, нечувствительность к терапии). Подобное вмешательство имеет как самостоятельную терапевтическую ценность,  
20 так и повышает эффективность традиционных методов терапии.

#### Краткий перечень иллюстраций

Фиг.1 Результаты иммуногистохимического окрашивания  
гистологических срезов опухоли мышей получавших 5 дневный курс  
терапии Доксорубицином (2мг/кг ежедневно внутривенно) и I (0,5 мг/кг;  
25 четыре раза в день на протяжении 5 дней).

А - доксорубицин + ДНКаза

В - доксирубицин

Лучший вариант осуществления изобретения.

Выделение свободно циркулирующей ДНК из плазмы крови.

Свежую (не более 3-4 часов после забора) плазму крови с добавленным антикоагулянтом (цитрат натрия) откручивали на подушке из Ficoll-PlaquePlus( Amersham-Pharmacia) при 1500g 20 минут при комнатной температуре. Плазму (1/2 от всего количества) аккуратно отбирали, не  
5 задевая остаток клеток на подушке фиколла и откручивали при 10 000 g 30 минут чтобы избавиться от обломков клеток и дебриса. Супернатант отбирали, не затрагивая осадок, добавляли до 1% саркозила, до 50мМ трис-HCl, pH 7,6, до 20 мМ ЭДТА, до 400 мМ NaCl, и равный объем смеси фенол-хлороформ 1:1. Полученную эмульсию инкубировали при  
10 65°C 2 часа, затем отделяли фенол-хлороформ центрифугированием при 5000g в течении 20 минут при комнатной температуре. Процедуру депротеинизации фенол-хлороформом повторяли идентичным способом трижды, после чего водную фазу обрабатывали хлороформом, затем диэтиловым эфиром. Отделение от органических растворителей  
15 производили центрифугированием при 5000g в течении 15 минут. К полученной водной фазе добавляли равный объем изопропанола и инкубировали в течение ночи при 0°C. После осаждения нуклеиновые кислоты отделяли центрифугированием при 0°C, 10000g в течении 30 минут. Осадок нуклеиновых кислот растворяли в буфере, содержащем  
20 10мМ трис-HCl , pH 7,6, 5 мМ ЭДТА, и наносили на подушку из ступенчатого хлористого цезия ( 1М, 2.5М, 5.7М) в центрифужной пробирке для ротора SW60Ti. Объем ДНК составлял 2 мл, объем каждой ступеньки CsCl – по 1 мл. Ультрацентрифугирование проводили в приборе L80-80 (Beckman) 3 часа при 250000 g. ДНК отбирали с  
25 поверхности ступеньки 5.7М по фракциям. Фракции диализировали 12 часов. Будет добавлено мМ трис-HCl, pH 7,6, 1мМ ЭДТА при 4°C. Наличие ДНК во фракциях определяли агарозным электрофорезом, с визуализацией ДНК бромистым этидием. Количество ДНК определяли спектрофотометрически (Beckman DU70) в кювете объемом 100мкл,

снимаемая спектр от 220 до 320 нм. Средний выход ДНК в расчете на 1 мл плазмы составлял 10-20 нг.

#### Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови

Нами был разработан новый метод выделения и клонирования ДНК из плазмы крови, позволяющий конструировать неамплифицированные плазмидные библиотеки такой ДНК с представительностью до миллиона клонов со средним размером в 300-500 пар оснований из 50 мл крови даже с учётом существенного присутствия в плазме различных больных повышенного уровня липополисахаридов и неидентифицированных примесей, существенно затрудняющих очистку нуклеиновых кислот. Таким образом, репрезентативный анализ можно проводить и с меньшими количествами образца плазмы – 10-20 мл в зависимости от присутствия патологических контаминантов. Выделенная по ранее описанному протоколу ДНК была подвергнута дополнительной тщательной депротеинизации с применением протеиназы К (Sigma) при 65°C для удаления прочно связанных белков. После депротеинизации и однократной обработки фенол-хлороформом при 65°C, ДНК осаждали 2,5 объемами этанола в течение ночи. Затем ДНК либо обрабатывали рестриктазой EcoRI в течение 3 часов, либо Pfu полимеразой (Stratagene) в присутствии 300 мкМ всех дезоксинуклеотидтрифосфатов для удаления «липких» концов. Достроенную ДНК фосфорилировали полинуклеотидкиназой T4 (30U, 2 ч.). Полученные препараты лигировали в плазмиду pBluescript (Stratagene), переваренную EcoRI или PvuII соответственно, и десфосфорилированную щелочной фосфатазой CIP (Fermentas) в течение 1 часа. Для лигирования обычно использовали 1 мкг вектора и 0,1-0,5 мкг сывороточной ДНК. Лигирование проводили при помощи Rapid Ligation Kit (Roche) 10 часов при 16°C. Объем лигазной смеси составлял 50 мкл. Лигированную библиотеку трансформировали в клетки DH12S

(Life Technologies) с применением электропоратора (BioRad). Для трансформации одной библиотеки использовали 12-20 электропорационных кювет. Для контроля на чашки с 1,5% агаром и средой LB, содержащей 100мкг/мл ампициллина высевали разведения библиотеки  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ . В обоих случаях представительность библиотеки составляла примерно  $2-3 \times 10^6$  клонов. Теоретически, набор последовательностей ДНК, циркулирующих в плазме, должен соответствовать набору последовательностей ДНК генома. Апоптоз клеток в норме сопровождается практически количественной и неспецифической деградацией ДНК до её выхода из клетки, поэтому в плазме должны быть представлены наиболее часто встречающаяся ДНК – повторяющиеся элементы генома в пропорции соответствующей неспецифической деградации ДНК. К таким элементам относятся L1 повторы, сателлитная ДНК, повторы Alu, MER, MIR, THE, и некоторые другие. Количество уникальных последовательностей должно быть невелико, в соответствии с их малым процентом в геноме человека и может не детектироваться без ПЦР в клонированной ДНК.

Библиотека ДНК плазмы крови больного раком в клинически продвинутой стадии.

Мы сконструировали библиотеку ДНК плазмы крови пациента с диагностированной мезотелиомой в поздней стадии. Представительность библиотеки составила около  $8.5 \times 10^5$  клонов, что вполне удовлетворительно, учитывая весьма небольшое (около  $5 \mu\text{g}$ ) количество ДНК, полученной после очистки от нехарактерных для здорового донора липополисахаридов, присутствовавших в плазме в сверхвысокой концентрации. Анализ 96 клонов длиной от 300 до 1000 пар оснований дал в высшей степени неожиданный результат. (Здесь следует отметить, что только один из проанализированных клонов не был идентифицирован, как человеческая ДНК, для остальных из

HumanGenBank была получена соответствующая информация, идентифицирующая ДНК этих клонов, как ДНК человека). Как указывалось выше, из имеющихся в литературе данных, логично было бы предположить значительную представленность в образцах ДНК

5 высокоповторяющихся элементов. Однако, по меньшей мере 55 из 96 клонов представляют уникальные последовательности ДНК человека. Учитывая реальное соотношение повторяющихся и уникальных элементов генома человека (примерно 95% к 5%) этот результат свидетельствует о том, что репертуар ДНК плазмы данного пациента

10 крайне отличен от состава ДНК в геноме. В данном случае наблюдается резкое обогащение препарата уникальными фрагментами ДНК. Из 55 фрагментов уникальной ДНК, идентифицированных при секвенировании 96 клонов из библиотеки ДНК плазмы больного функция или продукт соответствующего гена были идентифицированы

15 для 15 последовательностей. Таблицы 1- 15 приводят перечень этих последовательностей и информацию об их участии в формировании и поддержании злокачественного фенотипа.

Таблица 1

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 24	Семейство рецепторных белков, связанных с G белком .	Ключевая роль в регуляции жизнедеятельности раковых клеток. Функционирование связано с клеточной трансформацией, подавлением апоптоза, нечувствительностью к гормонам и метастазированием	Steeg P.S. ,Nat Rew Cancer,2003,v.3, pp.55-63. Raj G.V. ,J Urology, 2002,v.167, pp.1458-1463. Hoff A.O., Neoplasia,1999 v.1, pp.485-491.

Таблица 2

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 43	Snf2-связанный СВР активатор (SCRAP)	Транскрипционный активатор. Гомологи связаны с развитием синовияльной саркомы и лейкемии.	Thaete C., Hum Mol Genet, 1999, v.8, pp.5 85-91. Monroy M.A., J Biol Chem., 2001, v.276, pp.40721-40726 Lee D.W., Cancer Res., 2000, v.60, pp.3612-3622.

Таблица 3

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 51	SRY-box содержащий ген	Транскрипционный модулятор . Экспрессируется в эмбриогенезе. Гомологи связаны с медуллобластомами, опухолями гонад, высокометастатическо й меланомой.	Graham J.D., J Mol endocrinol, 1999, v.22, pp.295- 304. Lee C.J., J Neurooncol, 2002, v.57, pp.201- 214. Uehara S., Cancer Genet Cytogenet, 1999, v.11 3., pp.78-84. Tani M., Genomics, 1997, v.39, pp.30-37

Таблица 4

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 72	Тирозин-киназа	Гомологи играют ключевую роль в клеточной регуляцией при раке. Ряд тирозинкиназ является продуктом клеточных онкогенов.	Hunter T. , Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998,v.353.,pp.583-605. Scheijen B.,Oncogene, 2002,v.21.,pp.3314-3333.

Таблица 5

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 83	Fibroblast activation protein alpha; сериновая протеаза, связанная поверхностной мембраной.	Гомологи играют важную роль в инвазии и метастазировании раковых клеток. FAP активен в строме раковых опухолей и присутствует в карциномах различного происхождения.	Chen W.T, Enzyme Protein,1996,v.49.,p p.59-71. Scanlan M.J.,Proc Nat Acad Sci USA, 1994, v.91,pp.5657-5661. Mathew S., Genomics, 1995,v.25,pp.335-337.



Таблица 6

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 86	Brain testican	Протеогликан с неизвестной функцией.  Связан со злокачественным фенотипом эмбриональной рабдомиосаркомы.	Genini M., Int J Cancer, 1996, v.66, pp.571- 577.

Таблица 7

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 152	KRAB domain, Zn-finger proteins	Гомологи известны как транскрипционные репрессоры. Экспрессия наблюдается в раннем эмбриогенезе, в клетках нейробластомы, Ewing саркоме, Т-клеточной лимфоме, в процессе прогрессии и приобретении лекарственной устойчивости при раке легкого.	Oguri T., Gene, 1998, v.222, pp.61-67 Gou D.M., Biochim Biophys Acta, 2001, v.1518, pp.306-310 Margolin J.F., Proc Nat Acad Sci USA, 1994, v/91, pp.4509-4513. Bellefroid E.J., EMBO J, 1993, v.12, pp.1363- 1374. Gonzales-Lamuno D., Pediatr Pathol Mol Med, 2002, v.21, pp.531- 540. Marilee J.W., Gene, 1994, v.152, pp.227- 232.

Таблица 8

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 190	Антиген, связанный с меланомой	Антиген, узнаваемый аутологичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами	J.Immunol.166(4),2871 -2877,2001

Таблица 9

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 167	N-cadherin	Участвует в процессах клеточной адгезии. Играет важную роль в процессах роста инвазии и метастазирования раковых клеток.	Hazan R.B.,J Cell Biol, 2000,v.148,pp.779-790. Li G.,Cancer Res, 2001,v.61,pp.3819- 3825. Tran N.L.,J Biol Chem, 2002,v.277,pp.32905- 32914.

Таблица 10

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 197	FAF1: Fas associated factor 1	Фосфопротеин известный как проапоптотический фактор.	Jensen H.H.,Int J Biochem Cell Biol, 2001,v.33,pp.577-589. Ryu S.W.,Biochem Biophys Res Commun, 2001,v.286,pp.1027- 1032.

Таблица 11

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 114	Интерлейкин-7	Цитокин. Предполагается, что он является необходимым паракринным-аутокринным фактором роста для многих типов рака..	Trinder P., Int J Oncol, 1999,v.14,pp.23-31. Cosenza L., Cell Signalling, 2002,v.14,pp.317-325.

Таблица 12

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 208	DEAD Box RNA helicase – like protein	Гомологи связаны с метаболизмом РНК. Экспрессируются в пролиферирующих раковых клетках.	Iggo R.D., Mol Cell Biol, 1991,v.11,pp.1326-1333. Causevic M., Oncogene, 2001,v.20,pp.7734-7743.

Таблица 13

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 97	Lipin 1	Один из регуляторов ответа раковых клеток на цитотоксические препараты.	Brachet A. et.al., Oncogene, 2002,v.21,pp.8361-8371

Таблица 14

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 121	Dynein	Принимает участие в транспорте белка p53, гиперэкспрессирован при раке простаты и гепатоцеллюлярном раке.	Bull J.H., et.al., Br J Cancer, 2001, v.84, pp.1512-1519. Giannakakou P., et.al., Nat Cell Biol, 2000, v.2, pp.709-717 Jiang J., et.al., Gene, 2001, v.281, pp.103-113.

Таблица 15

Клон	Продукт	Участие в онкогенезе	Источник
Клон 178	Белок Ramp	Связан с развитием клеток человеческой эмбриональной карциномы.	Cheung W.M., et.al., J Biol Chem, 2001, v.276, pp.17083-17091

Таким образом, из 15 последовательностей с идентифицированной функций или продуктом, кодирующих самые разнообразные продукты (протеинкиназы, ростовые факторы, протеиназа, регуляторные ядерные белки, адгезионные молекулы), 14 описаны в литературе, как имеющие отношение к формированию и поддержанию злокачественного фенотипа. Лишь продукт клона 197, идентифицированный как проапоптотический фактор, формально не установлен как фактор, связанный со злокачественной прогрессией. Однако, ряд литературных данных свидетельствует о возможной связи высокого индекса апоптотической активности раковой опухоли с ее прогрессией (Nishimura R., et al., J Surg Oncol, 1999, v.71, pp.226-234.) и о возможной роли факторов,

индуцирующих апоптоз, в формировании и поддержании иммуносупрессии при злокачественном росте (O'Connel J., et al., Dis Esophagus, 1999, v.12, pp.83-89).

Наиболее представленной из повторяющихся элементов в данном  
5 препарате оказалась альфа-сателлитная ДНК (30 клонов). Можно сказать, что по отношению к другим секвенированным последовательностям, альфа-сателлитная ДНК оказалась единственным высокоповторяющимся элементом генома человека, ведущим себя в составе данного образца, именно как повтор. Остальные высокоповторяющиеся элементы либо  
10 присутствовали в виде одного или нескольких клонов (вариант L1, и MLT2b), либо не обнаружены среди проанализированных образцов (MER, Alu, TNE, MIR,  $\beta$ -сателлиты). Если исходить из имеющихся знаний, что состав ДНК плазмы должен в основном повторять состав ДНК генома, то перечисленные повторы должны были быть  
15 представлены в подавляющем числе клонов, в то время как уникальные и умеренно повторяющиеся последовательности вообще не должны обнаруживаться при анализе столь малого числа клонов ДНК. Полученный результат ясно свидетельствует об особом пути образования ДНК плазмы у ракового больного. На это указывает и  
20 другой неожиданный результат проведённого анализа - обнаружение в данном препарате фрагментов сразу двух новых умеренно повторяющихся последовательностей неизвестного до недавнего времени типа - дубликонов. Дубликоны были впервые обнаружены в геноме человека менее двух лет назад . Известные дубликоны (Eichler  
25 E.E., et al., Genome Res, 1998, v8, pp.791-808; Ji Y., et al., Genome Res, 2000, v.10, pp.597-610; Pujana M.A., et al., Genome Res, 2001, v.11, pp.98-111) – значительные по размеру участки ДНК, размноженные в числе нескольких копий преимущественно в рамках какой-то одной хромосомы (в отличие от других повторов, которые достаточно

равномерно распределены по геному). Образование и экспансию дупликонов сейчас связывают и с различными генетическими синдромами (например с синдромом Прадера-Вилли/Ангельмана, и с эволюцией мультигенных семейств, таких как MHC (Shiina T., et al., Proc Nat Acad Sci USA, 1999, v.96, pp.13282-13287), и с хромосомной нестабильностью в опухолях .

Следует отметить, что анализ клонов из ДНК плазмы крови больного дал следующие неожиданные результаты.

ДНК плазмы крови больного раком высокообогатена уникальными генами. Из 96 проанализированных клонов 55 клонов содержат фрагменты уникальных генов человеческого генома. Из 15 последовательностей с известной функцией, идентифицированных в библиотеке, 14 генов имеют отношение к процессам прогрессии опухолей и поддержанию злокачественного фенотипа.

В препарате ДНК плазмы обнаружено резкое обеднение по наиболее распространённым повторам человека, таким как MER, Alu, TNE, MIR,  $\beta$ -сателлиты.

Весьма важным результатом является обнаружение в препарате двух последовательностей с характеристиками ранее не известных дупликонов, что свидетельствует о представленности дупликонов в подобных образцах ДНК .

Библиотека ДНК плазмы крови здорового донора

Для подтверждения ценности метода клонирования и секвенирования ДНК плазмы крови для идентификации уникальных генетических последовательностей генома, мы сконструировали библиотеку ДНК плазмы крови здорового донора. Известно, что плазма клинически здоровых людей так же содержит ДНК, правда в значительно меньшем количестве, чем плазма раковых больных (Shapiro B., et al.,

Cancer, 1983, v. 51, pp. 2116-2120). Представительность библиотеки составила около  $8 \times 10^5$  клонов.

Анализ 70 клонов длиной от 300 до 1000 пар оснований дал еще более интересный результат. Из 70 проанализированных клонов 58  
5 представляют собой уникальные последовательности ДНК генома человека. Из них по данным HumanGenBank лишь для 14 определена функция или продукт соответствующего гена.

Всего 12 клонов содержали фрагменты повторяющихся последовательностей, при этом без предпочтения в отношении альфа-  
10 сателлитной ДНК.

Таким образом, неожиданно установлено, что ДНК плазмы крови здорового и больного раком содержит в основном уникальные фрагменты генома человека. При онкологической патологии уникальные последовательности ДНК из плазмы крови соответствуют генам,  
15 продукты которых участвуют в формировании злокачественного «фенотипа» опухолевых клеток.

Основываясь на этом нашем неожиданном открытии, мы предположили, что ДНК циркулирующая в плазме крови больных может являться мессенджером горизонтального переноса генетической  
20 информации при опухолевых заболеваниях, способствуя накоплению и распространению в популяции опухолевых клеток генов, необходимых для формирования и поддержания «злокачественного фенотипа».

Соматический мозаицизм – состояние являющееся следствием присутствия в организме генетически неидентичных популяций  
25 соматических клеток. По современным представлениям, многие неопухолевые и неинфекционные (т.н. соматические) заболевания человека (например диабет, атеросклероз, хронические неспецифические заболевания легких и другие), в том числе и процесс старения человека, связывают с появлением и распространением (экспансией) в процессе

развития индивидуума клонов соматических клеток, несущих «мутантные» гены. (Youssoufian H., et al., Nature Rew. Genet., 2002,v.3,pp.748-758; J.Vijg, Mutation Res.,2000,v.447,pp.117-135; R.Erickson, Mutation Res.,2003,v.543,pp.125-136; Andreassi M.,Mutation Res.,2003,v.543,pp.67-86;Anderson G., et al., Trends in Pharmacological Sci.,2003.,v.24,pp.71-76). Ярким примером подобного процесса служит прогрессия митохондриальной гетероплазмы (экспансия мутантной митохондриальной ДНК) при различных заболеваниях и в процессе старения (E.Jazin et al., Proc Nat Acad Sci USA, 1996, v.93,pp.12382-12387; Michikawa Y. Et al.,Science,1999,v.286,pp.774-779; Calloway C. Et al.,Am J Hum Gen,2000,v.66,pp.1384-1397).

В качестве двух альтернативных моделей возникновения соматического мозаицизма рассматривают возможность появления множественных мутаций «de novo» в поликлональном клеточном пуле либо клональную экспансию мутантного клона клеток (Khrapko K., et al., Mutation Res.,2003,v.522,pp.13-19).

В процессе работы над изобретением нами обнаружено, что ДНК циркулирующая в крови здоровых людей играет существенную роль в развитии соматического мозаицизма, а ее связывание, разрушение или инактивация подавляют развитие соматического мозаицизма. Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующего в плазме крови дает леченый эффект при заболеваниях, связанных с развитием соматического мозаицизма.

Приведенные ниже примеры показывают роль ДНК, циркулирующей в плазме крови больных в развитии нечувствительности опухолей к химиотерапии, развитии метастатического процесса при развитии сепсиса и ряде других патологических состояний. Обнаружен высокий терапевтический эффект от уничтожения, связывания или инактивации ДНК плазмы крови.



Роль свободно циркулирующей ДНК в прогрессии опухолей

Материалы и методы.

Использовалась бычья панкреатическая ДНКаза I (Fermentas) и рекомбинантная человеческая ДНКаза I (Дорназа; Genetech). Раствор ДНКазы для введения готовился растворением матричного раствора ДНКазы в стерильном фосфатном буфере непосредственно перед введением. Циклофосфамид и Доксорубицин разводились в соответствии с указанием инструкции.

В проведенных сериях опытов *in vitro* мы не наблюдали подавляющего эффекта ДНКазы I рост культур опухолевых клеток (при концентрации ДНКазы I до 100 мкг/мл), ДНК плазмы крови мышей-опухоносителей получали в соответствии с методикой описаной ранее.

Использовали высокометастатический и низкометастатический штаммы мышинной карциномы легких Люиса и карциномы Эрлиха. Клетки росли в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% пеницилин-стрептомицина в среде с 5% углекислого газа. Для индукции опухолей у мышей клетки выращивали до монослоя, отделяли с помощью раствора трипсин-ЭДТА. Клетки трижды отмывали центрифугированием в фосфатном буфере и ресуспендировали до  $0,5 \times 10^7$  в 1 мл. Жизнеспособность определяли по включению метиленового синего в гемоцитометре. Для введения животным использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток. Использовали мышей линии C57B1, и белые беспородные, полученные из питомника «Рапполово». Вес животных составлял 24-26 грамм. Животные содержались по 6-7 штук в клетке на стандартной диете без ограничения воды. Клетки LLC в дозе  $5 \times 10^5$  в 100 мкл. фосфатного буфера вводили в мягкие ткани бедра. Опухоль Эрлиха перевивали под кожу правого бока введением 0,2 мл 10% -ной взвеси клеток в изотоническом растворе хлорида натрия

В некоторых экспериментах исследовали содержание ДНК в плазме крови мышей. ДНК выделяли по ранее описанному протоколу. Содержание ДНК измеряли спектрофотометрически.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами:

5 Пример 1.

Влияние ДНК азы I при ежедневном двукратном введении на рост опухоли Эрлиха у мышей.

Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших

- 10 ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера.

Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера.

- 15 Результаты экспериментов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	86+/-12	-	-
2	33+/-6	61%	p<0,001
3	34+/-7	60%	p<0,001

- 20 Полученные данные указывают, что введение ДНК азы вызывает выраженное торможение развития опухоли у мышей.

Пример 2

Использование различных схем введения ДНКазы для торможения развития опухоли Эрлиха.

В наших экспериментах терапевтической мишенью ДНКазы является ДНК, циркулирующая в плазме крови больных. Для обеспечения наибольшего терапевтического эффекта необходимо длительное присутствие ДНКазы в плазме крови в каталитически эффективных количествах. В связи с этим многократное введение ДНКазы должно давать лучший эффект по сравнению с двукратным ее введением в той же суточной дозе.

- Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).  
 Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу два раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 1 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера.  
 Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутривенно в 200 мкл фосфатного буфера. Результаты экспериментов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	98+/-14	-	-
2	23+/-6	76	P<0,001
3	32+/-6	67%	P<0,001

- Полученные данные указывают, что дробное (четырёхкратное) введение ДНКазы при той же суммарной суточной дозе действительно вызывает более значительное угнетение роста опухоли, чем двукратное введение. Содержание ДНК в плазме крови мышей 2 группы по окончании курса лечения составило 38,3 нг/мл, в то время как у мышей контрольной группы 104,8 нг/мл; у мышей 3 группы – 55,1 нг/мл. У здоровых мышей

- содержание ДНК в плазме составило 12,0 нг/мл. ( $p < 0,01$ ). Таким образом, многократное введение ДНКазы в течение суток приводит к более выраженному снижению содержания ДНК в плазме больных животных и более выраженному подавлению роста опухоли, по сравнению с 2х
- 5 кратным введением той же суточной дозы.

### Пример 3

- Совместное использование ДНК азы и противоопухолевого препарата доксорубицина. Группа 1 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль). Группа 2- 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха,
- 10 получавших Доксорубицин один раз в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2мг/кг внутривенно. Группа 3 – 10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера и Доксорубицин
- 15 один раз в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 2мг/кг внутривенно. Группа 4-10 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получавших ДНКазу четыре раза в день ежедневно с 3 по 7 день после перевивки опухоли в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно в 200 мкл фосфатного буфера. Результаты экспериментов оценивали по
- 20 торможению роста опухоли (ТРО), выраженному в процентах к данным контроля, полученных в последний день введения ДНКазы с использованием стандартной формулы.

Размер опухоли на 7 день после перевивки

Группа	Объем опухоли	T%	P
1	98+/-14	-	-
2	57+/-10	42	$P < 0,05$
3	20+/-6	78	$P < 0,01$
4	0	100%	

Полученные данные указывают, что доксорубицин самостоятельно угнетает рост опухоли слабее чем ДНКазы. При совместном применении проявляется выраженный синергизм между ДНКазой и доксорубицином, выражающийся в полном подавлении роста опухолей (опухоли не  
5 определялись не у одного из экспериментальных животных).

#### Пример 4.

Влияние ДНК азы на формирование бактериальной биопленки.

Для выявления возможных механизмов действия ДНК-азы на взаимодействие бактерий с организмом хозяина мы оценили её влияние  
10 на формирование биопленок.

Эксперименты проводили на модели биопленок, получаемых на поверхности стекла при лабораторном культивировании. Были использованы неродственные грамположительные (*Staphylococcus aureus* VT-209) и грамотрицательные (*Escherichia coli* ATCC25922)  
15 бактерии. Бактерии засевали в синтетическую среду М9 с добавками, необходимыми для использованных штаммов бактерий, в количестве  $10^9$  бактерий/мл и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  на протяжении 72 часов. ДНК-азу добавляли в количество 100 мкг/мл сразу после внесения бактерий. В контроле добавляли идентичный объем фосфатного буфера. Отдельные  
20 флаконы отбирали для анализа каждые 24 часа.

Стекла промывали PBS буфером, фиксировали, окрашивали метиленовым синим и изучали с помощью световой микроскопии.

В результате установлено, что в присутствии ДНКазы не происходило образование нормальной биопленки. Наблюдалось только прилипание к  
25 стеклу отдельных микроорганизмов, которое не приводило к образованию микроколоний и биопленок.

Контрольные высевы из флаконов для определения числа в них жизнеспособных бактерий, способных образовывать колонии на плотной

среде (КОЕ), показало, что в присутствии ДНКазы не происходит гибели клеток, приводящей к снижению числа КОЕ по сравнению с контролем. Таким образом, полученные данные указывают, что ДНКазы не вызывает гибели стафилококков и эшерихий, но мешает их кооперативному поведению, приводящему к формированию биопленок.

#### Пример 5.

Использование ДНК азы для лечения экспериментального сепсиса.

Исследование проводили на беспородных белых мышах 24-26 гр. Животным в ретроорбитальный синус вводили патогенный штамм *Staphylococcus aureus* VT-2003R в количестве  $1 \times 10^{10}$  бакт/животное. ДНК азу вводили внутрибрюшинно. В контрольной группе по аналогичной схеме вводили изотонический раствор хлорида натрия или пенициллин. Каждая группа включала 10 животных. Введение препарата продолжалось 1-3 дня со дня заражения 4 раза в день по 500 мкг/кг внутрибрюшинно. Пенициллин вводили внутримышечно. Эффективность действия оценивали по числу животных, выживших после гибели последнего погибшего в контрольной группе. В контрольной группе к 3 дню погибли все зараженные животные. Среди животных, получавших ДНК-азу к 3 дню остались живы 6 животных. Защита составила - 67%. Полученные данные указывают на возможность и эффективность использования ДНК азы для лечения инфекционных состояний.

#### Пример 6.

Уровень свободно циркулирующей в плазме ДНК у онкологических больных и у здоровых доноров.

ДНК плазмы крови онкологических больных и ДНК плазмы крови здоровых доноров отличаются не только своим генетическим репертуаром, но и количеством ДНК, содержащейся в плазме крови. В таблице ниже приведены данные по содержанию ДНК в плазме крови у

10 больных различными формами опухолей и 10 здоровых добровольцев. Выделение ДНК из плазмы и определение концентрации ДНК проводили по протоколу, описанному ранее.

Пациент	Пол, возраст	Опухоль, стадия	Содержание ДНК; нг\мл
1	М, 67	Карцинома легкого T2N2M0	123
2	Ж, 37	РМЖ T2N0M0	78
3	Ж, 53	Карцинома желудка T3N2M1	90
4	М, 54	РТК T2N2M2	340
5	М, 64	РТК T2N1M0	182
6	М, 56	Карцинома легкого T3N2M1	99
7	Ж, 49	РТК T2N1M0	75
8	М, 65	Карцинома желудка T3N1M0	120
9	М, 36	Остеогенная саркома T3N1M2	243
10	Ж, 50	РМЖ T3N1M0	165
11	М, 24	Доброволец	10
12	М, 32	Доброволец	27
13	Ж, 21	Доброволец	45
14	Ж, 19	Доброволец	7
15	Ж, 21	Доброволец	13
16	Ж, 23	Доброволец	89
17	М, 28	Доброволец	11
18	Ж, 32	Доброволец	15
19	Ж, 25	Доброволец	17
20	М, 38	Доброволец	5

- 5 Из таблицы видно, что содержание ДНК в плазме крови здоровых добровольцев значительно ниже, чем в плазме больных различными формами злокачественных новообразований.

## Пример 7

Последовательности ДНК клонов, полученных из ДНК свободно циркулирующей в плазме больного злокачественной мезотелиомой.

Клон 1

5 Дупликон, хромосома 15 и Y

Последовательность №1.

Клон 3

Уникальный, хромосома 2

Последовательность №2

10 Клон 8

MLT2B повтор

Последовательность №3

Клон 9

Центромерная сателлитная ДНК

15 Последовательность №4

Клон 10

MLT2B повтор

Последовательность №5

Клон 20

20 L1MC4-like (LINE-элемент)

Последовательность №6

Клон 15

Алфа-сателлитная ДНК

Последовательность №7

25 Клоны 18, 21

Алфа-сателлитная ДНК

Последовательность №8

Клон 24

Уникальный, семейство G protein-связанных белков, хромосома 6



- Последовательность №9  
Клон 25  
Уникальный, хромосома 3  
Последовательность №10
- 5 Клон 26  
SatB1/Vimentin/nuclear matrix связывающая ДНК  
Последовательность №11  
Клон 33  
Дупликон, хромосома 10
- 10 Последовательность №12  
Клон 32  
Альфа-саттелитная ДНК  
Клон 35  
LTR повтор
- 15 Последовательность №13  
Клон 36  
Уникальный, хромосома 18  
Последовательность №14  
Клон 37
- 20 Уникальный, хромосома 4  
Последовательность №15  
Клон 41  
Последовательность №16  
Клон 43
- 25 Snf2-related CBP activator protein (SCRAP) Уникальный, хромосома 16.  
Последовательность №17  
Клон 45  
Уникальный , хромосома 3  
Последовательность №18

- Клон 47  
Альфа-сателлитная ДНК  
Клон 51  
Уникальный, SRY-бокс содержащий ген
- 5 Последовательность №19  
Клон 52  
Повтор  
Последовательность №20  
Клон 53, 55
- 10 Альфа-сателлитная ДНК  
Последовательность №21  
КЛОН 56  
ЦЕНТРОМЕРНЫЙ ПОВТОР  
Последовательность №22
- 15 Клон 60  
Повторяющийся на нескольких хромосомах ген, содержит MER5A  
повтор.  
Последовательность №23  
Клон 62
- 20 Повтор  
Последовательность №24  
Клон 65  
Уникальный, хромосома 3  
Последовательность №25
- 25 Клон 71  
Уникальный, хромосома 2  
Последовательность №26  
Клон 72  
Уникальный, хромосома 8

- Последовательность №27  
Клон 73  
Уникальный  
Последовательность №28
- 5 Клон 78  
Transposon Tigger фрагмент  
Последовательность №29  
Клон 81  
Последовательность №30
- 10 Повтор (LINE)  
Клон 82  
Уникальный , хромосома 1  
Последовательность №31  
Клон 83
- 15 Уникальный ,Fibroblast activation protein alpha; cell surface serine protease,  
хромосома 2  
Последовательность №32  
Клон 79  
Альфа-сателлитная ДНК
- 20 Клон 86  
Уникальный, высокая гомология с brain testican , хромосома 4  
Последовательность №33  
Клон 90  
Уникальный, хромосома X
- 25 Последовательность №34  
Клон 93  
Уникальный, хромосома 9  
Последовательность №35  
Клоны 89 и 92

- Альфа-саттелитная ДНК  
Клон 96  
Фрагмент LINE.  
Последовательность №36
- 5 Клон 97  
Уникальный, хромосома 2, Lipin  
Клон 98  
Уникальный, хромосома X  
Последовательность №38
- 10 Клон 102  
Уникальный, хромосома 17  
Последовательность №39  
Клон 99  
Альфа-саттелитная ДНК
- 15 Клон 105  
Уникальный, хромосома 13  
Последовательность №40  
Клон 106  
Уникальный, хромосома 9
- 20 Последовательность №41  
Клон 107  
Уникальный, хромосома 8  
Последовательность №42  
Клон 111
- 25 Уникальный, хромосома 12  
Последовательность №43  
Клон 112  
Уникальный, хромосома 5  
Последовательность №44

- Клон 114  
Уникальный, хромосома 8, Interleukin 7  
Последовательность №45  
Клон 116
- 5 Уникальный, хромосома 1  
Последовательность №46  
Клон 121  
Уникальный, хромосома 5, Dynein  
Последовательность №47
- 10 Клон 115; 119;120  
Альфа-саттелитная ДНК  
Клон 125  
Уникальный, хромосома 9  
Последовательность №48
- 15 Клон 127  
Уникальный, хромосома 20  
Последовательность №49  
Клон 130  
Уникальный, хромосома не определена.
- 20 Последовательность №50  
Клон 124  
SatB1/Vimentin/nuclear matrix связывающая ДНК  
Клон 133  
Альфа-саттелитная ДНК
- 25 Клон 137  
MLT1A2 повтор  
Последовательность №51  
Клон 140  
Уникальный, хромосома 2, zinc finger protein, subfamily 1A

- Последовательность №52  
Клон 141  
Уникальный, хромосома 2  
Последовательность №53
- 5 Клон 143  
Фрагмент Alu-повтора  
Последовательность №54  
Клон 144  
Уникальный, хромосома 2
- 10 Последовательность №55  
Клон 146  
Уникальный, хромосома 4  
Последовательность №56  
Клон 139 и 142
- 15 Альфа-сателлитная ДНК  
Клон 148  
Повтор (хромосомы 1,2 и 4)  
Последовательность №57  
Клон 152
- 20 Уникальный, хромосома 16, KRAB-Domain, zinc finger protein  
Последовательность №58  
Клон 154  
Уникальный хромосома 9  
Последовательность №59
- 25 Клон 161  
Фрагмент LINE  
Последовательность №60  
Клон 151  
Уникальный, хромосома 5

- Последовательность №61  
Клон 150  
Уникальный, хромосома 1  
Последовательность №62
- 5 Клон 153  
Уникальный, хромосома 11  
Последовательность №63  
Клон 159  
Уникальный, хромосома 6
- 10 Последовательность №64  
Клон 163  
Альфа-саттелитная ДНК  
Последовательность №65  
Клон 166
- 15 Уникальный, хромосома 12  
Последовательность №66  
Клон 167  
Уникальный, хромосома 18 , cadherin 2, type 1, N-cadherin  
Последовательность №67
- 20 Клоны 169, 170  
Уникальный, хромосома 18  
Последовательность №68  
Клон 178  
Уникальный, хромосома 1, RAMP: RA-regulated nuclear matrix-associated
- 25 protein  
Последовательность №69  
Клон 180  
Уникальный, хромосома 20  
Последовательность №70

- Клон 181  
Уникальный, хромосома 18  
Последовательность №71  
Клон 185
- 5    Альфа-сателлитная ДНК  
     Последовательность №72  
     Клон 187  
     Мег повтор  
     Последовательность №73
- 10   Клон 188  
     HSATII повтор  
     Последовательность №74  
     Клон 189  
     Уникальный, хромосома 9
- 15   Последовательность №75  
     Клон 190  
     Уникальный, хромосома 1, melanoma antigen recognized by T cells 2  
     Последовательность №76  
     Клон 195
- 20   Уникальный, хромосома 10  
     Последовательность №77  
     Клон 196  
     Уникальный, хромосома X  
     Последовательность №78
- 25   Клон 197  
     Уникальный, хромосома 1, FAF1: Fas (TNFRSF6) associated factor 1  
     Последовательность №79  
     Клон 200  
     Уникальный, хромосома 8



- Последовательность №80  
Клон 202  
Уникальный, хромосома 13  
Последовательность №81
- 5 Клон 205  
Альфа-сателлитная ДНК  
Последовательность №82  
Клон 206  
Повтор
- 10 Последовательность №83  
Клон 208  
Уникальный, хромосома 8, Human DEAD box RNA helicase-like protein  
Последовательность №84  
Пример 8. Последовательности ДНК клонов, полученных из свободно
- 15 циркулирующей в плазме здорового донора ДНК.  
Клон 1  
Уникальный, хромосома 5  
Последовательность №85  
Клон 9
- 20 Уникальный, хромосома 21  
Последовательность №86  
Клон 7  
Уникальный, хромосома 3  
Последовательность №87
- 25 Клон 8  
Уникальный, хромосома 4  
Последовательность №88  
Клон 10

- 18S RNA ген  
Последовательность №89  
Клон 11  
Повтор Alu
- 5 Последовательность №90  
Клон 13  
Уникальный, хромосома 3  
Последовательность №91  
Клон 15
- 10 Уникальный, хромосома 1  
Последовательность №92  
Клон 16  
Уникальный, хромосома 3, neutral endopeptidase  
Последовательность №93
- 15 Клон 17  
Уникальный, хромосома 8  
Последовательность №94  
Клон 18  
Уникальный, хромосома 1
- 20 Последовательность №95  
Клон 21  
Уникальный, хромосома 19, Zinc Finger protein  
Последовательность №96  
Клон 22
- 25 Уникальный, хромосома 18  
Последовательность №97  
Клон 23  
Уникальный, хромосома 7, muskelin 1  
Последовательность №98

- Клон 25  
Уникальный, хромосома 11  
Последовательность №99  
Клон 27
- 5 Повтор  
Последовательность №100  
Клон 29  
Уникальный, хромосома 6  
Последовательность №101
- 10 Клон 30  
Уникальный, хромосома 14  
Последовательность №102  
Клон 31  
Уникальный, хромосома 17
- 15 Последовательность №103  
Клон 32  
MER4В повтор  
Последовательность №104  
Клон 33
- 20 Уникальный, хромосома 1  
Последовательность №105  
Клон 34  
Уникальный, хромосома 2  
Последовательность №106
- 25 Клон 35  
Повтор  
Последовательность №107  
Клон 36  
Уникальный, хромосома 1

- Последовательность №108  
Клон 37  
HERVH повтор  
Последовательность №109
- 5 Клон 41  
Уникальный, хромосома X  
Последовательность №110  
Клон 42  
Уникальный, хромосома 6
- 10 Последовательность №111  
Клон 43  
Уникальный, хромосома 22, KREMEN1  
Последовательность №112  
Клон 44
- 15 Уникальный, хромосома 14  
Последовательность №113  
Клон 45  
Уникальный  
Последовательность №114
- 20 Клон 46  
Уникальный, хромосома 20  
Последовательность №115  
Клон 47  
Nf-карраВ
- 25 Последовательность №116  
Клон 38  
Уникальный, хромосома 16  
Последовательность №117  
Клон 48

- Уникальный, хромосома 6  
Последовательность №118  
Клон 53  
Уникальный
- 5 Последовательность №119  
Клон 51  
Уникальный, хромосома 5  
Последовательность №120  
Клон 59
- 10 Уникальный, хромосома 4, NFkB1: nuclear factor of kappa light  
polyreptide gene enhancer  
Последовательность №121  
Клон 61  
Повтор
- 15 Последовательность №122  
Клон 62  
L1 повтор  
Последовательность №123  
Клон 64
- 20 Дубликон, хромосома 7  
Последовательность №124  
Клон 65  
Рибосомальная ДНК  
Последовательность №125
- 25 Клон 66  
Рибосомальная ДНК  
Последовательность №126  
Клон 75  
Повтор

- Последовательность №127  
Клон 76  
Уникальный, хромосома 4  
Последовательность №128
- 5 Клон 83  
Уникальный, хромосома 4  
Последовательность №129  
Клон 85  
Уникальный, хромосома 2, phospholipase C, epsilon
- 10 Последовательность №130  
Клон 87  
L1PA3 повтор  
Последовательность №131  
Клон 86
- 15 Уникальный, хромосома 5, CRTL1: cartilage linking protein 1  
Последовательность №132  
Клон 89  
Alu повтор  
Последовательность №133
- 20 Клон 92  
Уникальный, хромосома 6  
Последовательность №134  
Клон 100  
Уникальный, хромосома 6
- 25 Последовательность №135  
Клон 105  
AluSx повтор  
Последовательность №136  
Клон 111

- Alphoid repetitive ДНК  
Последовательность №137  
Клон 112  
Уникальный, хромосома 9
- 5 Последовательность №138  
Клон 113  
Уникальный, хромосома 22  
Последовательность №139  
Клон 114
- 10 AluSx повтор  
Последовательность №140  
Клон 116  
Уникальный, хромосома 9, 17kD fetal brain protein  
Последовательность №141
- 15 Клон 123  
Уникальный, хромосома 5  
Последовательность №142  
Клон 124  
Уникальный хромосома 13
- 20 Последовательность №143  
Клон 126  
Уникальный, хромосома 8  
Последовательность №144  
Клон 130
- 25 Уникальный, хромосома 1  
Последовательность №145  
Клон 131  
Уникальный, хромосома 4  
Последовательность №146

- Клон 136  
Уникальный, хромосома 8  
Последовательность №147  
Клон 141
- 5 Уникальный, хромосома 2  
Последовательность №148  
Клон 146  
Уникальный, хромосома 16  
Последовательность №149
- 10 Клон 147  
Уникальный, хромосома 5, nicotinamide nucleotide transhydrogenase  
Последовательность №150  
Клон 149  
Уникальный, хромосома 9
- 15 Последовательность №151  
Клон 151  
Уникальный, хромосома 16  
Последовательность №152  
Клон 152
- 20 Уникальный, хромосома 6, BAI3: brain-specific angiogenesis inhibitor 3  
Последовательность №153  
Клон 153  
Уникальный, хромосома 10, GAD2: glutamate decarboxylase 2  
Последовательность №154
- 25 Клон 155  
Уникальный, хромосома 9  
Последовательность №155  
Пример 9  
Чувствительность ДНК, циркулирующей в плазме, к действию ДНКаз.



ДНК из сыворотки свежей крови доноров (смесь от 5 доноров) выделяли стандартным фенол-хлороформным методом.

Осадок нуклеиновых кислот промывали 70% этанолом и растворяли в трис-ЭДТА буфере. Количество ДНК определяли по данным  
5 спектрофотометрии при длине волны 260 нм (СФ-46). Полученную ДНК изучали электрофорезом в 0,8% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. Часть полученной ДНК обрабатывали ДНКазой I в течение 3 часов при 37°C. В результате разделения в геле обработанной и необработанной ДНК установлено:

10 Необработанная ДНК образует после электрофореза одну компактную полосу, что свидетельствует о сравнительно идентичных по размеру фрагментах ДНК, циркулирующих в крови.

После обработки ДНКазой полоса в геле исчезает полностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в сыворотке  
15 циркулирует ДНК, чувствительная к действию ДНКаз, и что она может быть ими полностью разрушена.

#### Пример 10

Результаты эксперимента по влиянию поликлональной сыворотки, содержащей антитела против ДНК на продолжительность жизни мышей  
20 с карциномой Эрлиха.

ДНК, циркулирующая в плазме крови онкологических больных может быть уничтожена или инактивирована не только разрушающими ДНК ферментами (например, ДНКазой), но и другими способами.

Антитела против ДНК выделяли из крови больных системной красной  
25 волчанкой по методике Shuster A.M.(Shuster A.M. et.al., Science, v.256, 1992, pp.665-667). Подобные анти-ДНК антитела способны не только связывать, но и осуществлять гидролиз ДНК.

Группа 1 – 7 мышей с привитой карциномой Эрлиха (контроль).

Группа 2- 6 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получивших на 3й день после перевивки опухоли внутривенную инъекцию фракции человеческих анти ДНК антител (IgG) по 200 мкг на одно животное.

Группа 3- 6 мышей с привитой карциномой Эрлиха, получивших на 3й день после перевивки опухоли внутривенную инъекцию фракции неспецифического человеческого иммуноглобулина (IgG) по 200 мкг на одно животное.

Эффект определяли по торможению роста опухоли на 7 день после перевивки (ТРО, выраженное в процентах)

10 Размер опухоли через 7 дней после перевивки

Группа	Объем опухоли	Т%	Р
1	85+/-12	-	-
2	45+/-6	52%	p<0,001
3	79+/-7	7%	p<0,001

Результаты показывают, что однократное введение антител против ДНК обладает выраженным противоопухолевым эффектом. Введение фракции антител, не содержащих антител, направленных против ДНК, не вызывает противоопухолевого эффекта.

Пример 11

Эффект вакцинации мышей фракцией ДНК плазмы крови, полученной от животных с карциномой Эрлиха, на перевивку и рост карциномы Эрлиха у иммунизированных животных.

20 ДНК из плазмы мышей с карциномой Эрлиха выделяли по описанной выше методике на 5 й день после перевивки опухоли. В качестве адьюванта для иммунизации использовали положительно заряженные многослойные липосомы. Образец ДНК смешивался с липосомами (20 мкг ДНК в 1 мг липидов).

25 Группа 1 – 6 неиммунизированных мышей

Группа 2 – 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю (1мкг ДНК из плазмы крови в 50мкл липосомальной суспензии, содержащей 50мкг липосом).

Группа 3- 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю 50 мкл липосомальной суспензии, содержащей 50мкг липосом без ДНК.

Группа 4- 6 мышей, иммунизированных трехкратно внутрикожно с интервалом в 1 неделю (1мкг ДНК телячьего тимуса (Sigma) в 50мкл липосомальной суспензии, содержащей 50 мкг липосом).

10 Через неделю после последней иммунизации всем мышам, включая неиммунизированный контроль, была перевита опухоль Эрлиха.

Результаты эксперимента оценивали по выживаемости животных на 30 и 50 день после перевивки опухоли.

Группа	30 день (число живых \ павших животных в группе)	50 день (число живых \ павших животных в группе)
1	0-6	0-6
2	5-6	3-6
3	0-6	0-6
4	2-6	0-6

15 Таким образом, иммунизация мышей ДНК из плазмы крови приводит к выраженному увеличению продолжительности жизни животных, привитых опухолью Эрлиха.

#### Пример 12

Выделение ДНК из матрикса биопленок, образованных грамположительными и грамотрицательными бактериями.

20 В опытах использованы биопленки, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Биопленки смывали с агара фосфатным буфером, после чего клетки и матрикс разделяли центрифугированием. Для выделения ДНК

из матрикса использовали стандартный фенол-хлороформный метод. Количество ДНК определяли по данным спектрофотометрии при длине волны 260 нм (СФ-46). Полученную ДНК изучали электрофорезом в 0,8% полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. Часть

5 полученной ДНК обрабатывали ДНК азой 1 в течение 3 часов при 37°C. В результате разделения в геле обработанной и необработанной ДНК установлено:

Необработанная ДНК образует после электрофореза одну компактную полосу, что свидетельствует о сравнительно идентичных по размеру

10 фрагментах ДНК, присутствующих в матриксе.

После обработки ДНК азой полоса в геле исчезает полностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что матрикс микробных сообществ грамположительных и грамотрицательных бактерий содержит внеклеточную ДНК, которая может быть разрушена

15 ДНКазой.

#### Пример 13

Динамика экспрессия Р-гликопротеина в опухоли Эрлиха у мышей, получающих терапию Доксорубицином, в процессе лечения и эффект ДНКазы I.

20 Лечение Доксорубицином вызывает в ткани опухоли экспрессию Р гликопротеина, одного из основных медиаторов MDR (Multidrug Resistance) фенотипа. Ниже приведены результаты иммуногистохимического окрашивания гистологических срезов опухоли мышей получавших 5 дневный курс терапии Доксорубицином (2мг/кг

25 ежедневно внутривенно) и Доксорубицином + ДНКазы I (0,5 мг/кг; четыре раза в день на протяжении 5 дней). Лечение начинали на 3й день после перевивки опухоли. Препараты тканей изготавливались на 8 день после перевивки опухоли. После 5 дневного курса терапии в тканях опухоли наблюдается интенсивная многоочаговая экспрессия Р-

гликопротеина (Фиг.1). При комбинированном лечении Доксорубин + ДНКазы как общий уровень экспрессии Р-гликопротеина так и количество Р-гликопротеин позитивных очагов в ткани опухоли значительно меньше (Фиг.1). Таким образом, лечение ДНКазой тормозит  
5 в опухоли развитие фенотипа множественной лекарственной устойчивости, вызываемое действием противоопухолевого антибиотика Доксорубина.

#### Пример 14

Влияние ДНК плазмы мышей C57Bl с опухолью LLC , подвергшихся  
10 химиотерапевтическому лечению Доксорубином на рост и метастазирование опухоли LLC у мышей C57Bl , получающих терапию Доксорубином и эффект ДНКазы 1.

Опухоль LLC была перевита 30 мышам C57Bl. На 3 день после перевивки 20 мышей получили курс химиотерапии Доксорубином в  
15 дозе 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней, и 10 мышей получили терапию Циклофосфамидом в дозе 15 мг/кг однократно внутривенно на 3 день после перевивки. Подобный курс лечения не приводит к излечению животных, но приводит к замедлению роста опухоли на 8 день на 50% у животных, получивших химиотерапию  
20 Доксорубином и к замедлению роста опухоли на 8 день на 30% у животных , получивших химиотерапию Циклофосфамидом.

На следующий день после окончания курса химиотерапии животных усыпляли, собирали суммарную плазму крови мышей 1 группы и мышей 2 группы. Суммарную фракцию ДНК плазмы крови после выделения  
25 хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых LLC.

1 группа – 7 мышей контроль

2 группа – 6 мышей химиотерапия Доксорубином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день.

- 3 группа – 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Доксорубицином (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения).
- 5 4 группа - 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течении 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Циклофосфамидом (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения)
- 10 5 группа - 6 мышей химиотерапия Доксорубицином по схеме 2 мг/кг внутривенно ежедневно в течение 5 дней с 3 по 8 день + внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции ДНК мышей, получивших химиотерапию Доксорубицином (0,05 мкг ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в 1 й день лечения ) + внутрибрюшинное четырехкратное введение ДНКазы I в дозе 0,5мг/кг в 1й и 2й день лечения (по 4 внутрибрюшинных инъекции в сутки)
- 15

Размер опухоли на 8 день после перевивки

Группа	Объем опухоли
1	127+/-13
2	67+/-7
3	115+/-20
4	75+/-11
5	82+/-9

- Таким образом, ДНК плазмы крови мышей, получавших химиотерапию, специфическим образом способствует развитию лекарственной устойчивости опухолей к химиотерапевтическому лечению. Введение ДНКазы препятствует реализации этого эффекта.
- 20

Пример 15

Влияние ДНК плазмы мышей C57Bl с высокометастатическим штаммом опухоли LLC, на метастазирование низкометастатического штамма опухоли LLC у мышей C57Bl, и эффект ДНКазы 1.

Опухоль LLC была перевита 30 мышам C57Bl. Мыши (20  
5 животных) получили прививку высокометастатического штамма и 10  
мышей получили прививку низкометастатического штамма. На 9 день  
после перевивки окончания курса химиотерапии животных усыпляли, и  
собирали суммарную плазму крови мышей 1 группы и мышей 2 группы.  
Суммарную фракцию ДНК плазмы крови хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  в  
10 фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых опухолью LLC.

1 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC.

2 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC +  
15 внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции  
ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг  
ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки ).

3 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC +  
внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции  
20 ДНК мышей с привитым низкометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК  
в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки )

4 группа - 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC +  
внутривенное двукратное (через день) введение суммарной фракции  
ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг  
25 ДНК в 200 мкл фосфатного буфера в на 7й и 8й день после перевивки )  
+ внутрибрюшинное четырехкратное введение ДНКазы I в дозе 1мг/кг  
на 7й и 8й день лечения ( по 2 внутрибрюшинных инъекции в сутки)

5 группа – 6 мышей с привитым высокометастатическим штаммом LLC.

Оценивалось количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки (N).

Результаты эксперимента представлены в таблице

Группа	Нср.
1	12,0
2	24,1
3	14,6
4	11,6
5	33,6

- Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ДНК из
- 5 плазмы мышей с высокометастатическим штаммом LLC усиливает метастазирование низкометастатического штамма LLC. Введение больным животным ДНКазы I препятствует реализации этого эффекта.

#### Пример 16

- 10 Влияние ДНКазы I на продолжительность жизни мышей C57Bl с привитой опухолью LLC (высокометастатический штамм).
- В эксперименте участвовало 5 групп мышей, привитых LLC.
- 1 группа – 7 мышей (контроль).
- 2 группа – 6 мышей, получавших внутрибрюшинно терапию ДНКазой в
- 15 дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 5 день после перевивки
- 3 группа – 6 мышей, получавших внутрибрюшинно терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 10 день после перевивки.
- 4 группа – 6 мышей, получавших терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 15 день после перевивки.
- 20 5 группа – 6 мышей, получавших терапию ДНКазой в дозе 1 мг/кг 2 раза в сутки с 3 по 18 день после перевивки.



Результаты эксперимента оценивали по выживаемости животных на 30 и 50 день после перевивки опухоли.

Группа	30 день (число живых \ павших животных в группе)	50 день (число живых \ павших животных в группе)
1	0-7	0-7
2	0-6	0-6
3	3-6	0-6
4	5-1	3-3
5	6-0	6-0

Хотя во 2ой и в 3ей группах наблюдалось выраженное торможение роста опухолей к последнему дню лечения ДНКазой, после отмены препарата  
 5 рост опухоли возобновлялся и к 25 дню размер опухолей в этих группах сравнивался с контролем.

Наиболее длительный курс терапии ДНКазой (с 3 по 18 день; группа 6) привел к максимальному продлению жизни больных животных. Торможение роста опухоли к 18 дню составляло более 95%)

10 Во всех экспериментах однократное и многократное введение человеческой ДНКазы I в дозе до 2,5 мг/кг. (наибольшая доза, использованная в экспериментах) не оказывало токсического действия на животных.

Таким образом, ДНКазы I не оказывает прямого цитотоксического  
 15 действия на опухолевые клетки (в наших экспериментах в концентрации 100 мкг/мл опытах *in vitro*), а полученные в примере данные подтверждают, что противоопухолевый эффект связан с разрушением ДНК в плазме крови, и лечебный эффект ДНКазы возрастает вместе с увеличением продолжительности курса лечения ДНКазой.

## Пример 17

Влияние различных способов разрушения, инактивации и связывания ДНК плазмы крови на способность ДНК плазмы крови мышей C57Bl с высокометастатическим штаммом опухоли LLC усиливать  
5 метастазирование низкометастатического штамма опухоли LLC у мышей C57Bl.

Мыши (100 животных) получили прививку высокометастатического штамма опухоли LLC. На 9 день после перевивки и окончания курса химиотерапии животных усыпляли и собирали суммарную плазму крови  
10 мышей. Суммарная фракция ДНК плазмы после выделения крови хранилась при  $-20^{\circ}\text{C}$  в фосфатном буфере.

В эксперименте участвовало 6 групп мышей, привитых низкометастатическим штаммом LLC.

- 1 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC
- 15 2 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворялись в 500 мкл свежей гепаринизированной крови).
- 20 3 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл. свежей плазмы). Перед введением образец подвергали фотохимической  
25 дезинфекции (добавление 1 мкМ метиленового синего с последующим облучением красным светом в течении 10 минут ( $\sim 60\,000$  Люкс).
- 4 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим

штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей плазмы). Перед введением образец дважды пропускали через колонку, содержащую DEAE-целлюлозу. 5 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови). Перед введением в образец добавляли 1 мкг фрагмента А растительного токсина Рицина и инкубировали 1 час при 37°C. Рипин является представителем семейства RIP (белки инактивирующие рибосомы) токсинов, широко используемых для создания иммунотоксинов. Кроме способности инактивировать рибосомы эти белки обладают способностью деаденилировать ДНК. Для реализации токсического эффекта каталитическая единица А токсинов RIP II типа должна быть доставлена в клетку субъединицей В. В отсутствие субъединицы В цепь А не токсична, однако полинуклеотид-аденингликозидазная активность цепи А может быть использована для инактивации ДНК, циркулирующей в плазме.

6 группа – 6 мышей с привитым низкометастатическим штаммом LLC + внутривенное двукратное (на 7й и 8й день после перевивки) введение суммарной фракции ДНК мышей с привитым высокометастатическим штаммом (0,05 мкг ДНК перед введением растворяли в 500 мкл свежей гепаринизированной крови). ДНК. Суммарная фракция ДНК перед введением подвергалась ферментативному метилированию (I.Muiznieks et.al., FEBS Letters, 1994, v.344, pp.251-254).

Оценивали количество метастатических узлов в легких на 15 день после перевивки.

Результаты эксперимента приведены в таблице.

Группа	Нср.
1	12,0
2	22,5
3	14,1
4	15,5
5	15,1
6	12,3

Результаты свидетельствуют, что все примененные методы подавляли способность ДНК плазмы крови мышей с высокометастатическим штаммом опухоли LLC вызывать усиление метастазирования низкометастатического штамма опухоли LLC.

- 5 Пример 18. Влияние терапии ДНКазой I на развитие соматического мозаицизма.

В качестве модели соматического мозаицизма была изучена частота мутаций гена HPRT в Т-лимфоцитах крови. Человеческий HPRT ген (Хромосома Xq26) кодирует конститутивно экспрессируемый, но не эссенциальный фермент, вовлеченный метаболизм пуриновых оснований. Клонирование проводили по методике описанной Bigbee W (Bigbee W. Et al., Mutation Res., 1998, v.397, pp.119-136). Клонированию подвергались лимфоциты периферической крови 8 больных, получавших курс 3х недельной иммуностимулирующей терапии препаратом Неовир

10 после хирургического удаления опухоли. Из 8 больных 4 пациента дополнительно получали терапию человеческой рекомбинантной ДНКазой I ( 200 мкг/кг внутривенно, 4 раза в сутки в течении 3 недель). Частота встречаемости HPRT-дефицитных клонов в крови больных, получавших терапию ДНКазой I, в среднем была в 3 раза ниже таковой в

15 крови больных , получавших только иммуностимулирующую терапию.

20

Пример 19. Влияние терапии ДНКазой I на продолжительность жизни старых крыс.

В опыте использовали 24-месячных белых беспородных крыс. В опытной группе (10 животных) крысам, начиная с 24 месячного возраста, вводили полисиалированную человеческую ДНКазу I в количестве эквивалентном 500мг/кг немодифицированного фермента внутривенно два раза в неделю на протяжении 2 месяцев. Крысам контрольной группы вводили плацебо. Продолжительность жизни крыс в контрольной группе составила в среднем 27, 8 месяца. Продолжительность жизни крыс в опытной группе составила в среднем 30,1 месяц.

Пример 20 . Влияние терапии ДНКазой I на жизнеспособность бета-клеток поджелудочной железы и эндотелия аорты

Бета-клетки эмбриональной поджелудочной железы человека и эндотелиальные клетки аорты человека использовали для формирования первичной клеточной культуры. Через 24 часа после пассажа в одной экспериментальной серии в клеточные культуры добавляли ДНК, выделенную из плазмы больного тяжелой формой диабета 2 типа, осложненного системным атеросклерозом (0,0025 мкг на 1 мл культуральной среды) а в другой экспериментальной серии ДНК больного перед введением в культуру подвергали ферментативному метилированию. Через 24 часа оценивали содержание жизнеспособных клеток по включению красителя трипанового синего.

Результаты эксперимента приведены в таблице:

Процентное содержание жизнеспособных клеток через 48 часов после пассирования .

Клетки	Контроль	ДНК больного	Метилированная ДНК
В-клетки	73%	43%	61%
Эндотелий	62%	35%	55%

### Промышленная применимость

Таким образом, настоящее изобретение свидетельствуют о том, что разрушение (связывание, инактивация) ДНК, циркулирующей в плазме крови, при онкологических и микроб индуцированных

5 заболеваний дает выраженный лечебный эффект.

В подтверждение найденного эффекта установлено, что ДНК плазмы крови больных содержит уникальные гены, принимающие участие в формировании и поддержании злокачественного фенотипа опухоли.

10 Связывание, разрушение или инактивация ДНК, циркулирующей в плазме крови дает леченый эффект при заболеваниях, связанных с накоплением и распространением в клетках организма соматических мутаций.

1. ДНК, циркулирующая в плазме крови, может быть уничтожена,

15 инактивирована или удалена из плазмы крови, что может быть достигнуто использованием ДНКаз, сорбентов, антител или других методов, приводящих к инактивации разрушением, связыванием или модификацией циркулирующей ДНК.

Лечение, направленное на уничтожение ДНК плазмы крови,

20 приводит к выраженному противоопухолевому эффекту при незначительной собственной токсичности.

Лечение, направленное на уничтожение ДНК плазмы крови, в сочетании с традиционными методами противоопухолевой терапии приводит к выраженному противоопухолевому эффекту.

25 Эффективность лечения, направленного на уничтожение ДНК плазмы крови, может определяться путем мониторинга количества ДНК и генетических маркеров опухоли в плазме крови пациента, получающего такое лечение.

Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови онкологических больных может быть использовано для изучения генетических процессов, участвующих в онкогенезе и идентификации новых генов, связанных с процессами онкогенеза.

- 5 Клонирование и секвенирование ДНК плазмы крови здоровых людей может быть использовано для изучения процессов функционирования генома в норме и при развитии соматических заболеваний и идентификации новых генов, вовлеченных в эти процессы
- 10 Фармацевтические композиции, содержащие компоненты инактивирующие разрушением, связыванием или модификацией ДНК плазмы крови, используются для лечения больных злокачественными опухолями, инфекциями, соматическими заболеваниями или для продления жизни. Для осуществления эффективной терапевтической экспозиции действующего компонента, необходимой для разрушения
- 15 ДНК плазмы и достижения терапевтического эффекта, используются фармацевтически приемлимые композиции и модификации, системы доставки лекарств, обеспечивающие максимальную системную циркуляцию действующего компонента в плазме крови и его контакт с ДНК, циркулирующей в плазме. Основной путь введения —
- 20 внутривенный. Однако могут быть использованы другие методы введения, обеспечивающие поступление действующего компонента в системную циркуляцию - подкожный, внутримышечный, ингаляционный, внутрибрюшинный и др. Дозы и режимы введения при этом определяются природой используемого активного ингредиента,
- 25 зависят от пути введения. Эффект контролируется по уровню содержания и динамике ДНК в плазме крови, наличием в нем опухолевых, инфекционных и других генетических маркеров, и наступлением положительной клинической динамики заболевания.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний путем воздействия на биологические мишени  
5 внутри организма, отличающийся тем, что биологической мишенью является внеклеточная ДНК, в том числе, циркулирующая в плазме крови.
2. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по п.1, отличающийся тем, что внеклеточная  
10 ДНК инактивируется разрушением, связыванием или модификацией.
3. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК инактивируется разрушением, связыванием или модификацией путем введения в организм больного фармацевтического  
15 агента, способного разрушать, связывать или модифицировать свободно циркулирующую ДНК.
4. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по одному из пп.1-3, отличающийся тем, что внеклеточная ДНК инактивируется разрушением, связыванием или  
20 модификацией путем введения в организм больного фармацевтического агента, в количестве, достаточном для разрушения и терапевтическом режиме обеспечивающем разрушение, связывание или модификацию в течение периода времени, достаточного для достижения желаемого терапевтического эффекта.
- 25 5. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по одному из пп.1-4, отличающийся тем, что в организм больного вводят генетически модифицированные клетки или генотерапевтические конструкции, приводящих к синтезу в организме больного биополимеров, способных инактивировать путем связывания,



разрушения или модификации свободно циркулирующую в плазме крови больных ДНК.

6. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что
- 5 внеклеточная ДНК, циркулирующую в плазме инактивируется путем разрушения связывания или модификации экстракорпоральными методами очистки крови.
7. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, что
- 10 экстракорпоральная очистка крови больного от свободно циркулирующей ДНК достигается иммунной или аффинной сорбцией.
8. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, экстракорпоральная очистка крови больного от свободно
- 15 циркулирующей ДНК достигается методами гравитационной хирургии крови.
9. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1,2 или 6, отличающийся тем, что экстракорпоральная очистка крови больного от свободно
- 20 циркулирующей ДНК достигается биологической, химической или фотохимической инактивацией.
10. Способ лечения онкологических и/или инфекционных и/или соматических заболеваний по пп.1 или 2, отличающийся тем, что больного иммунизируют вакциной, содержащей в качестве антигена
- 25 ДНК, свободно циркулирующую в плазме больного, в том числе, в комплексе со связанными с ней белками.
11. Способ лечения онкологических заболеваний по одному из пп.1-10, отличающийся тем, лечение сочетается с хирургическими,

химиотерапевтическими, гормональными, лучевыми  
иммунотерапевтическими методами.

12. Фармацевтический агент для лечения онкологических и/или  
инфекционных и/или соматических заболеваний, представляющий собой  
5 вещество, обладающее дезоксирибонуклеазной активностью и/или  
способное инактивировать внеклеточную ДНК, в том числе,  
циркулирующую в плазме крови больных.

13. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество,  
обладающее дезоксирибонуклеазной активностью, представляет собой  
10 фермент дезоксирибонуклеазу.

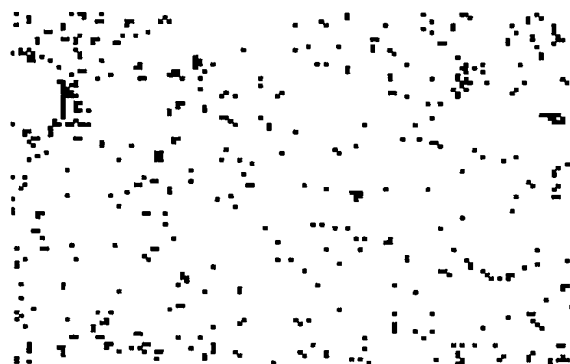
14. Фармацевтический агент по п. 13, отличающийся тем, что  
дезоксирибонуклеаза модифицирована для достижения лучших  
фармакодинамических и фармакокинетических показателей и  
представляет собой аналог дезоксирибонуклеазы с повышенной  
15 активностью, аналог дезоксирибонуклеазы, нечувствительный к  
эндогенным ингибиторам дезоксирибонуклеазы, полисиалированную  
дезоксирибонуклеазу, пегилированную дезоксирибонуклеазу,  
дезоксирибонуклеаза связанную или смешанную с фармацевтически  
приемлемым носителем, в том числе, с синтетическими и природными  
20 микросферами, липосомами, декстраном, и другими корпускулярные  
природными и синтетическими полимерными носителями.

15. Фармацевтический агент по одному из пп. 12-14, отличающийся  
тем, что он дополнительно содержит рибонуклеазу и/или липазу и/или  
протеиназу.

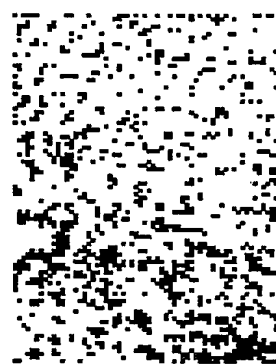
25 16. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество,  
обладающее дезоксирибонуклеазной активностью представляет собой  
антитела, обладающие нуклеазной активностью, в частности -  
поликлональные ДНК-абзимы, моноклональные ДНК – абзимы или их  
производные.

17. Фармацевтический агент по п. 12, отличающийся тем, что вещество, способное связывать ДНК, представляет собой антитела, способные связывать ДНК и его комплексы или их производные
18. Фармацевтическая композиция для лечения онкологических и  
5 инфекционных заболеваний, содержащая фармацевтический агент по одному из пп. 12-16 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.
19. Способ увеличения продолжительности жизни, отличающийся тем, что достигается путем, инактивации внеклеточной ДНК циркулирующей  
10 в плазме за счет разрушения связывания или модификации по п. 2-17.
20. Способ профилактики возникновения и развития патологий, связанных с возникновением и развитием соматического мозаицизма за счет разрушения связывания или модификации ДНК по п. 2-17.
21. Метод контроля эффективности лечения онкологических и/или  
15 инфекционных и/или соматических заболеваний, а также оценки развития инфекции и контроля эффективности лечения, направленного на продление жизни путем измерения биохимических показателей больного, отличающийся тем, что для контроля подобного лечения используется мониторинг количества, размера молекул,  
20 соотношение фракций, связи с белками, липидами и сахарами, последовательности нуклеотидов ДНК, свободно циркулирующей в плазме крови.
22. Использование ДНК плазмы крови и внеклеточной микробной ДНК для выявления ДНК, вовлеченной в процесс возникновения и развития  
25 заболеваний, состоящее в её клонировании, секвенировании, идентификации генов, уникальных и повторяющихся последовательностей с их последующим изучением.

1/1



A



B

Фиг.1

IAP20 Rec'd PCT/PTO 12 JAN 2006

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Tets Viktor Veniaminovich, Genkin Dmitry Dmitrievich  
 <120> Способ лечения онкологических, инфекционных и соматических заболеваний, методы контроля эффективности лечения, фармацевтические агенты и композиция для осуществления лечения  
 <210> 1  
 <211> 485  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 1  
 acgacggcca gtgagcgcgc gtaatacgac tcactatagg gcgaattggg taccggggccc 60  
 cccctcgagg tgcacgggat cgataagctt gatatcgaat tctgaccacc ccaagggtggc 120  
 catccttgtc cctgtgattc cagatctcca gaactggagg tctagcttca gggaaaaccc 180  
 agattttctt ggcttagccc acctgacagc taatcactgg aaatggggtg ggctggtaga 240  
 gtccttttgt caggttttgt gtcaagagag ggaggaggaa agatgggagg gaggtagcaa 300  
 aactggcttc aatggaacta tgtaagttaa tatagaatgg caaagggatg tttcttccaa 360  
 ggaagaatt cctgcagccc ggggatcca ctagttctag agcggccgcc accgcggtgg 420  
 agctccagct tttgttcctt ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca 480  
 tagct  
 <210> 2  
 <211> 244  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 2  
 gaattctcaa attattactg aggaaaatgt gacagtgcct caaagcagta gtaatttttt 60  
 ctcatatgc tgcatttatt attaaaacca acagtggaca gtgaatgact aactgatcct 120  
 tttttgggaa tattacttcc aaatgaacgt taacttaaag attggaatat gaacacacta 180  
 ttgcttttac actagagagg ttactcctgg ccactcttcc agcagcagtt agcttcagga 240  
 attc  
 <210> 3  
 <211> 230  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 3  
 gaattcgag taacttcctt gtgttggtg tattcaactc acagagttag acgatcgttt 60  
 acacagagca gacttgaaac actctttttg tggaatttca agtggagatt tcaattgttt 120  
 gaggtcaatg gtagaatagg aaatatcttg ctatagaaac tagacagaat gattctcaga 180  
 aactcctttg tgatgtgtgc cttcaactca cagagttaa cttttctttt  
 <210> 4  
 <211> 218  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 4  
 gaattctcat gaaattgaaa tggatggact catcatcgaa tggattcgaa tggaatcatc 60  
 gaataaaatt gattgag(a)at catcatcaaa tggaatcgaa tggatcatt gaatggaatc 20  
 gaatggaatc atcatcagat ggaaatgaat ggaatcgtca tagaatccaa tcgaatggat 180  
 tcattgaatg gaatcagatg gaatcatoga gtgactga  
 <210> 5  
 <211> 182  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 5  
 gaattctcta caggacaga actaatggaa tatatgtatt atacagggga gtttattaaa 60  
 cattaactca catgatcaca aggtcccga ataggctgtc tgcaggcagg ggcgaaggag 120  
 gccagtgaag ttccaaaact caagaaccta gagtcaatgt tcaagggc(?)a ggaagcatcc 180

2/24

ag  
 <210> 6  
 <211> 152  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 6  
 gaattcacag aaatcattgc cacaggcaag atctgatgaa ccttgatgaa tgctaaaatt 60  
 agttggtgaa agtttaagca gaaacagaat gtttgcataa aatgaagcaa aagaaggaaa 120  
 aaaaattatg agcccttgat ttaggggtct tt  
 <210> 7  
 <211> 131  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 7  
 gaattcttct gtctagagta acatgaagaa atcccgtttc caacgaaggc cctcaaggcg 60  
 gtcaattatc cacttcgaga ttctacagaa agagtgtttc aaaactgctc tatcaagaga 120  
 aatgtccac c  
 <210> 8  
 <211> 239  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 8  
 gaattcccag taacttcctt gtgttggtga cattcaactc acagagttga acgttccctt 60  
 agacagagca gatttgaaac actctttttg tgcaattggc aagtggagat ttcaagcgct 120  
 ttaagggtcaa tggcagaaaa ggaatatctt tcgtttcaaa actagacaga atcattcca 180  
 caaactgcgt tgtgatgtgt tcgttcaact cacagagttt aacctttctt ttcataagag  
 <210> 9  
 <211> 207  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 9  
 gaattctctt gacttccttg ggttttagcg tgagtgaaga ggcacggaga gggtttggag 60  
 ctttagggta aagcactgat ggaagaaagg aattcctgca gcccggggga tccactagtt 120  
 cttagagcggc cgccaccgcg gtggagctcc agcttttgtt cccttttagtg agggttaaaa 180  
 gcgcgcttgc gtaatcatgg tcatagc  
 <210> 10  
 <211> 223  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 10  
 gaattcatcg ctaggactgt gttcttgttt attgggatgg gaagggagag aaaagatgag 60  
 aggggcaaaa gagaaaattt tggaaaatga gaaacttact ttattgcact gtctgtgcaa 120  
 ttgttggtct taaggaacaa atacactaaa ttcaaagatg ataaaaaaaa aaacacagctt 180  
 cacagagctg tagtaaacac cagatgttga aagagaagcg tat  
 <210> 11  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 11  
 gaattccatt tgatgacaat tccattcaat accaattgat gatgtttatt tttgattcca 60  
 tttgatgatg attacattcg attccatttc atcatgattc cattcgattc cactcgatga 120  
 ttccattcga ttccattcaa tgattattcc acttgagtcg attcgatgac tccattcgat 180  
 tgtattcgat ggtgattg  
 <210> 12  
 <211> 217

3/24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 12

```

gaattctgcc aagcagtgac ttgattcatg aacactcact ggatgctgac tctgttgctc 60
ttctgagtgc tggggtagag gagaggatga ggtggacgca cagttcttgc ttttatgagc 120
ttatgttcta ggaaattcaa acaagtattt tttcaggcag gtagtatgaa atagcaggaa 180
gaggaagcag gctaaagga cacagagtga ttggggg

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 223

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 13

```

gaattcaggg ctgcagaaat ttgtgtaagt aaagaggagc agaatgttaa tagccaagac 60
aatgcaaaaa atgcattcaa ggtgttttga aaccttcacg gtagccctc ccattacaag 120
cctggaggnc tgggagggaa aaataatccc tgaaccagga caagggccct atccctattt 180
ctctgtacag tctcaggaca cagcactttg catcccagca gct

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 14

```

gaattcgctt acagtcagtt acaaatgctt tttagatctt caatgcttct gtgaagcctc 60
atatttgctg ttcagacaga cactataatg gagatggaat aaatggacag caactacaca 120
ggacggtgtg ggcagatggt gttggagcga ggggtgcagg tggagccac aggagaggaa 180
ggctgattga tcttctatgg ggagagcttc atagcacggg ggtggggcac acctgactgg 240
caagctgttt ggtgtgag

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 239

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 15

```

gaattctttt gaactagctg tgttttgaca gaggtttttt tttttttttt tctttttttg 60
gttttttgct tctctgacaa aggccttttg aagaatgagc ttcttcccc acatctttat 120
ttatttatatt atttttaagc tatgtctcagg aaaatgaaca tttctccttt gcagttgata 180
acagcattta caaggtatac agcatatagg gttgttccaa attccttccc agataacca

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 226

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 16

```

gaattcctga atgggtggg(5)6 6actgtgtgt ctctggccct attccctctc caggacaaac 60
ctcacccttt cctgcaaag tactcaaaat agtacattta tccacgtcaa ttcagcaaag 120
gctgcagatc ctgggactac agtatctcag acgctgttct cagcgagctc atggtccagt 180
ggagagcaca gacaaacagc aaggcaggag aaatcgctc tgaagagccc aggag

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 156

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 17

```

gaattcagcc gtggcagtga gatggagtgt gtgtttagaa ctgttgattg atctggctct 60
ccctgattag gaggccgaga tcgagactcg gattgctgag ctgcggaagg agggtttctg 120
gtcactgaag aggctgccta aggtgccaga gcccc

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 191

&lt;212&gt; DNA

4/24

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 18

gaattctaca aaagaaataa agcagagatg tgaaaggaat ttcttcaact atacacattt 60  
 tgacataatc atcttctaac atggtgttta atttgctctg cttcacttag caatgatata 120  
 atgaatatatt cccattttat tatatatctt acaatatcac tttgaatgac tctcttaaga 180  
 gtgtattata c

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 312

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 19

cgacggccag tgagcgcgcg taatacgact cactataggg cgaattgggt accgggcccc 60  
 ccctcgaggt cgacggtatc gataagcttg atatcgcttg tgctgctgaag gatgcaattc 120  
 tagacagagt tagctgggaa tgcctcactg agaagggggc atttgagtaa aggcctgaaa 180  
 aggtgaagaa gaattcctgc agcccgggg tccactagtt cttagagcgc cgccaccgcg 240  
 gtggagctcc agcttttggt cccttttagt aggggttaatt gcgcgcttgg cgtaatcatg 300  
 gtcatactgt tt

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 20

gaattccagt ggaatcagtt gtaatgtctc ctttttcata tctgatttta tttagtgtct 60  
 ttttttctta gatagtcttg cttaaagggtt ctcaatttat cttttcaaaa aatcttttca 120  
 ttttggtgat cttttttatt attttcttca tttcatTTTT atttatttct gctctgatct 180  
 ttattatttc ttttcttcta ataatttttg gtttagttt

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 208

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 21

gaattctcag taacttcctt gtgttggtgt tattcaactc acagagttga acgatccttt 60  
 acacagagcg gacttgaaac actctttttg tgggaatttg aagtggagat ttcagccgcg 120  
 ttgaggtcaa tggtagaaaa ggaaatatct tcgtataaaa actagacaga atgattctca 180  
 gaaactcctt tgtgatgtgt gtgttcaa

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 22

gaattcaatg gaatggaatg gacaggaatg gaatggaatg gaaaggaatg gaggatggaatg 60  
 gactagaatg gaatggaatg gaatgaaatc aacccgattg gaatggaatg gaatgcaatg 120  
 gaatggaatg gaatcaactg gaaaggaatc aaatagaacg gaatggaata gaatggaatg 180  
 gattggaatg gaatggaatg gattcaaccc gaggatggaatg gaatggaata gaatggaata 240  
 aacaacgagt ggaatggaat gg

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 23

gaattcgttg aggagcttct ggaaagtga cattctgact cagcaggtat tggagtctgc 60  
 atttctcatg agcactcagg tgatgaaaga gctggctcct ggacacagct ctgaatagca 120  
 agggaatagc tttccttttag agaaatctgg aaaaagaacc actggagagc aatttaaaaa 180  
 ataacagaat ccagggaaag ctttaatttc cttttatt

&lt;210&gt; 24



5/24

```

<211> 213
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 24
gaattcaaag gaatcatcat caaatagaac cgaatggaat cctcattgaa tggaaatgaa 60
aggggtcatc atctaattgga atcgcatgga atcatcatca aatggaatcg aatggaatca 120
tcatcaaattg gaatcgaatg gaatcatcat caaatggaat ctgatggaat cattgaacag 180
aattgaatgg aatcgatcat gaatgaattg aat
<210> 25
<211> 229
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 25
gaattctgtg cgtatttttag aagtagaatt ataagatttg tggatatgtt agttttggag 60
tgtgaggtca aaggcgtttt gagcaacttg taagaaacca tttttaaggc ggaagtcggg 120
aattttgttt tttatatgtt gaatttgaaa tccttattaa acatccaagt ggagaggctg 180
gatagacaat taaatttaga ccctgaggtt cgggaaggaa gtccaatgg
<210> 26
<211> 216
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 26
gaattcttca agaaacatca aggagggatg tatagatagt tttttaaaaa accgaaatgt 60
aaaagaaata caagaagaat ggaaacatct acataacgag agtggaaaga aatgaaaata 120
gaggtagata gattagatag atagatagat agatagattg attgatggat tgatagattg 180
atagatatag aaataaaaaga aagaaaatag aagatg
<210> 27
<211> 244
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 27
gaattccaat gcaatgttaa acagaaagca gccctttttt tcaaaattta taggcaaggt 60
gtttaacata tggctaaata atgttaattt atagtaaata tccttcataa ggatgaagat 120
gtacccttct atttttagttt gctgagtgct ttttagtcat aattgagtgt tgacatctgt 180
caaataatttt ttctgcatct attaagacat ccatgtgata tttctctttt attctcttac 240
tatg
<210> 28
<211> 237
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 28
gaattcaatc accatogaat acaatcgaat ggagtcacgc aatcgactca agtggaaataa 60
tcattgaatg gaatcgaatg gaatcatcga gtggaatcga atggaatcat gatgaaatgg 120
aatcgaatgt aatcatcatc aaatggaatc aaaaataaac atcatcaatt ggtattgaat 180
ggaattgtca tcaaatggaa ttcctgcagc cggggggatc cactagtctt agagcgg
<210> 29
<211> 184
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 29
gaattctttc cagaaggttt ttaatttact ttgctcggct ccatcagggg aatcactatg 60
gcagctatag ccttaagaaa tttatttctt aaataagact tgagagtcag aattgcttct 120
ttatccatgg tctcgaggat gggatgttgt gatagcaggc gtgaaaacaa cattcatctc 180
ctgg
<210> 30

```

6/24

<211> 191  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 30  
 gaattcagaa tctggatggc aaggaagcgc atcaagatgc aggagaaagt tgaaacctaa 60  
 tccaaggaat acagtaaaac aatccagaag cttgaaagac aaaatagcca ttttaagaac 120  
 caaactgagc ttctggaagg gaaaaattta cttcaagaat ttcataatac aatcaaaagt 180  
 attttttttt t  
 <210> 31  
 <211> 143  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 31  
 Gaattccgct tggggaggga actgtcttcg tccaggaaaa tgtttttnat aagccaccca 60  
 tggtaaaagg agaagtcacg acggttaggg tgttggcagg aatcaaatta agaaaaggaa 120  
 tggctatcca tccggttgta tgt  
 <210> 32  
 <211> 169  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 32  
 gaattctaga ctgctgcacc tccatatacct cagcaactgg catgatgatg agcagggagt 60  
 tagtagaact aatacactaa tatgtaaatg aatgaatgaa tgtttcctga gtgtggcctt 120  
 aagtttctca gaagaagaca gttcatacac tggatgcataa aattctggg  
 <210> 33  
 <211> 124  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 33  
 gaattctagg acaaggatgat tgtcctagat tttctcttaa acgcctcctg ttagatagga 60  
 aatggccatt aatagagaag cttgcttgag ggagtaacct tgaaagccca ggcctggaca 120  
 cccg  
 <210> 34  
 <211> 214  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 34  
 gaattctaag tttatatagg ttacaacatc acagtaagaa tgtcacagag gggatatatgc 60  
 ttttcatcaa acaacaaatt gaaaattttt taactcttaa ggactgattt tgcttaacta 120  
 caagttatgc actgatggtg gtagcttcac aaatttagaa aagttccaaa ataatgctta 180  
 gaaagagtag ctatttaact tctcattgaa caaa  
 <210> 35  
 <211> 164  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 35  
 gaattcctgt gaatgtcgtt tcaaataatta ctcagcctac gcactgacca gaacttattt 60  
 tttacagaat cattttgaca ggaaaagtgt ttatgatagt tttgttggtg ttgttggtgt 120  
 tttgtttttt catcaccag gctgcttcac atttagagct gagt  
 <210> 36  
 <211> 119  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 36

7/24

gaattctgag aactagccct ttaagactgg tggagattta ttcaggaggg aagccctgcc 60  
 ccagggaataa gttgccaaga gacttgtnnt taggagatca ccagcccaaa tttccatga  
 <210> 37  
 <211> 208  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 37  
 gaattccctt catatTTTTg gtcaaagccc agtttttctg agtcgggtggg ctaaatggga 60  
 ttactctttc taatgaggca tccttggtgtg cttagaatca ctcttgactt tatcctgtcc 120  
 ccctcggtgt cctaacttac caggatggag agcatttcct cattccatgt tgttgggagg 180  
 ttggccact ggggtgacatc agcccagg  
 <210> 38  
 <211> 169  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 38  
 gaattcctta acccttaatt agctttgggt tttgctcaat atcctgaagc tgggcacagt 60  
 ctcaatgtaa ctattctcct aggggctgaa ctgggtgcta gtcacaaag tttggaatgt 120  
 cattttagaa gcaacctcta gaagtaatcc tggtaaagccc tagaagtaa  
 <210> 39  
 <211> 172  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 39  
 gaattcccat ctttttttgt gtgtgtgttt gagactgtat tttgcattgt cgtccacact 60  
 ggagtacagt ggcgtgatct ccgctcgctg caagctccgc ctcatggatt taagcgattc 120  
 tcctgcctca gcctcccaag tggctgggac tacagggtgc cgaccaacca cg  
 <210> 40  
 <211> 137  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 40  
 gaattctgtt acttggtgat gggaaaccgt gaagggttta agcaagactg tgatgtgctt 60  
 aggtttatta gaaggttcta tgctgctcag ctcctctgtc tagttctttg ctttattgac 120  
 tgtntcctca ctaaatg  
 <210> 41  
 <211> 152  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 41  
 gaattctttt ttccccagct ttatggagat ttaattgaca aataaaatgg catatattta 60  
 ggtgtatata tttgatata gtatacattg tgaaacgatt actataatga agttaattaa 120  
 catattcctc atcttgcata gtcaccattt tt  
 <210> 42  
 <211> 183  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 42  
 gaattctcca tgaaaacaga catatttgat atttaggtgc tttaatggac cctgaaaaga 60  
 aattagattg attcatttga agaataaatg tcgggtcccc gccctctaca tggtaaaact 120  
 cttccaaatg cttctactta atggaaatgg aaattacctc tcaaaacatt acaaaaacta 180  
 atg  
 <210> 43  
 <211> 162

8/24

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 43  
gaattccgac cactgctgac cgccaggcca cacaccgggtt ttnttcagga ggtctcaact 60  
agatgctaag ctccgaagtg gaactccctc aggcactttc tgttctaatt caggaattcc 120  
tcgagcccg gggatccact agttctagag cggccgccac cg  
<210> 44  
<211> 189  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 44  
gaattctgtg aaataattct cagcccagac ccaaggg(a)tc cacagctcag aaatagggtta 60  
tccagaagtg ttccaaacac tagatgacag tatcccagtg ctccaaacca gcttattact 120  
tggccagaat tcctgcagcc cggggatcc actagttcta gagcggccgc caccgcggtg 180  
gagctccag  
<210> 45  
<211> 190  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 45  
gaattctctg tctgtcgatt tcagtgattt tagtgctggt cctccaattg agtactagcc 60  
ataggtcttg gcttggcact cccatcccat agccctgtgc accatagctc tgggggtgaac 120  
tcaggcaaaa cgattttcgt cccagcttg ggagcagcag gggtggggac cttggcaatg 180  
gcaatggcag  
<210> 46  
<211> 266  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 46  
gtaatacgac tcactatagg gcgaattggg taccggggccc cccctcgagg tcgacgggtat 60  
cgataagctt gatatcggct tatcctgagc taggtcgagc ctttgctctc ctgacctagt 120  
tagttctcat tcaaccctgt gacaagggat gtggggctca gagaacggga ggggtcttccc 180  
tcaggtcaca tggccagggc atggagaggc aggacttgaa tccagggtcaa tgtgacccca 240  
gagcctagtg tggaaccg tccttt  
<210> 47  
<211> 164  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 47  
gaattctacc ctgggtagga tagtagctcc cctcaacttt acagcaaata cagctaacct 60  
tgctttacct gcgatcccgt ntttattttg ttgaattaga gaaactgagg gaagcagttc 120  
tctacactca ctttaccctt agagccctct acaatcaacc ctgt  
<210> 48  
<211> 112  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 48  
gaattcaaaag actgtnagat gtaagcagtg actganacan aggcaatgag atgagagggtg 60  
gaaaggagac caaatgtaaa agacagcaga aacttgagtg gacggtggca ca  
<210> 49  
<211> 114  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

9/24

<400> 49  
 gaattctgtt ggctttacct ttaacgtgtc caaaagtgc caattatcat tncgtcnttt 60  
 ngctgctact tggntcaagc cattagtatc ccttgctcca ataaactctt tcct  
 <210> 50  
 <211> 206  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 50  
 gaattcccag taacttcctt gtgttggtg tgttcaactc acagagttga actttcattt 60  
 acacagagca gatttgaaac actctttttg tggaatttgc aaatggagaa ttctgcagc 120  
 ccgggggac cactagttct agagcgccg ccaaccgggt ggagctccag cttttgttcc 180  
 ctttagcgag ggtaattgc gcgctt  
 <210> 51  
 <211> 169  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 51  
 cccccctcg aggtcgacgg tatcgataag ctggatatcg gcaacttctc gctctgtcct 60  
 cacatagga aagaggaagc tggtgccttc ctcttacaag agcactaate tcacatgggt 120  
 gtttacctc atgactttat ctaaaccctaa ttatctttca aagaatcta  
 <210> 52  
 <211> 141  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 52  
 gaattcttgt ttccagtga aatttagata atttatctca ggaattcctg cagcccgggg 60  
 ttccactag ttctagagcg gccgccaccg cgggtggagct ccagc-t-tg ttccctttag 120  
 ttaggg-taa ttgcgcttg c  
 <210> 53  
 <211> 203  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 53  
 gaattctata tatttcccct cttttcctga ctcttcagt acaatcctaa gaccgtgcta 60  
 ataacagaag acagtaatcc ctttttttag ccaaataatt tggaagccat gattttcttt 120  
 gcatatcatg aaagtgaacca tgggtgttga tattgtgggt agaagctttc aagtaaaaaa 180  
 gaactgtcat tcaactgaat tgg  
 <210> 54  
 <211> 162  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 54  
 gaattctagg ccaggcgcga tggttcacac ctgtaatccc agcattttcc cggaagcca 60  
 aggcaggcag atcacttgag gccaagagtt caagaccaac ctggccaaag gggtgaaatc 120  
 catctctact aaaaatacaa aaattagtcg ggcgcggcgg cg  
 <210> 55  
 <211> 193  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 55  
 gaattctatt tctaggaacg ttctcaaaca agcttaagag caaagtataa aaacgatgtt 60  
 cagcatataa taatatgaaa aaattttgtc ctagacattt tatatgaaaa tgtatacttt 120  
 agagcatgct tcaggaaaaa aagaaagaaa aattaatcct gggaaatggg tgacattaga 180  
 tacaggcgag tgg  
 <210> 56

10/24

```

<211> 169
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 56
gaattctgct tttatgagaa gtcagctgaa tgctatggaa aggagtatag agagtggctt 60
aaaagtttca ggcaagttca caccaaaact tgcattctaa cctccctgaa cctgtggtct 120
agaagggacc tatcagcaag atgataacca aaaatgtcta gaatctgag
<210> 57
<211> 141
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 57
gaattctaga gaacaatccc tactgacttc acacacaact taagaaatgc aagtaaaggg 60
ccgggcgcgg tggccagca cctgtaatcc cagtactttg ggagcctaga ggcagggtgt 120
cattggaagt caggagtcca a
<210> 58
<211> 183
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 58
gaattctctg atgtttagtt aggtatgacc tacagttaaa ggctttgctg cattccttac 60
gtttgtaggg tttctctccg gtatgactac ttcgatgtcg agtaacggac gttgaattac 120
gataaaaggc tttgccacat tttttgcatt tatagggttt ttctccagta tgaattccag 180
cag
<210> 59
<211> 185
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 59
gaattctatc aatgtcaatt aaatccagtt gatggatggc cataatttta aatctattta 60
cattttgggg tattttttta aataaaatct gtgattatct atcttttaat gaatgcctta 120
gatcattcac attaaagtga ttgttggtgt agttgtgttc atgtatacca tacttataac 180
tgttt
<210> 60
<211> 163
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 60
gaattctact aaaacttttag aaaagaaatt aacaccaatt ctcaaactat ttcagaaaat 60
tgaaaaggag aagcctctcc caactaattc tatgaatcca gcattacccc ttacccaaaac 120
cagacaaaga tgaacaaaaa taataagaag aaggaactct ggg
<210> 61
<211> 103
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 61
attttccctg ctgggtgtgt ccagagatcc tttctggcta gtctgctagc actgcatgtg 60
tcnaccagca tctcaacctc aactagctg caacacttgg cca
<210> 62
<211> 144
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 62
cctctccaaa aagaaaatct ctgccattct atgtacactg gctgcatgaa gatgtatgtn 60
tatgaattag cctgcatgtc tgggtccac cctgcacatg ctaacattcc tttccctccc 120

```

11/24

catacgagtc caaaaaaact atgc  
 <210> 63  
 <211> 173  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 63  
 tcagtccttca ggtgatattg aaatggaggc tgtaagggtt taataatata ggtttcaaaa 60  
 ccaggcagca acacatacta gccatgtaaa acttgagcta cccaacccg cctgggttgtt 120  
 gcttagtcct tctttgaaaa ttaaaattct gttctctgga aatagtattt agg  
 <210> 64  
 <211> 150  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 64  
 ttacaacctt tatgagattg gtgccattat caccattttc agacatgaaa aatacagcac 60  
 acacagttta agtaatatgc tgaattcctg cagcccgggg gatccactag ttctagagcg 120  
 gccgccaccg cgggtggagct ccagcttttg  
 <210> 65  
 <211> 159  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 65  
 ccagtaactt ccttgtgttg tgtacattca actcacagag ttgaacgttc ccttagacag 60  
 agcagatttg aaacactctt tttgtgcaat tggcaagtgg agatttcaag cgctttaagg 120  
 tcaatggcag aaaaggaaat atcttcgttt caaaactag  
 <210> 66  
 <211> 73  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 66  
 tcccaatcct tcctgtgact caagcntctg ctcattaggt atcctaggac aatattatgc 60  
 tgtntctatc aga  
 <210> 67  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 67  
 agccagagcc aagctctctc actctgcaga gaagcctcag tctttagaag acagttcagc 60  
 tttatccaga attcctgcag ccggggg  
 <210> 68  
 <211> 110  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 68  
 tatgatcaac aaatatatct tacaacatga gggtgcaata agatgagaaa ggttcgagag 60  
 tgtttatctt tagcaaatac atactatcgc gctcaaggta agtnttcaag  
 <210> 69  
 <211> 111  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 69  
 Tattgtgccc agagataatt gtccctgcagt cagagcattc tatgtntttt tctgtogttg 60  
 attaatcaag aggggttcag gcttccctgt aggaaaatgt ctaaagcata a  
 <210> 70  
 <211> 138

12/24

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 70  
attcatttat accctcattt attcatccaa cagccattca ataagcgtct gtgttcagcc 60  
atgctctgac actgattgan ttctgcagc cgggggatcc actagttcta gagcggccgc 120  
accgaggtgg acgtcagc  
<210> 71  
<211> 144  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 71  
caggttgatg aagaaacgga tattagtgc atgaagaaca gtcctgtctc tgtcagctgg 60  
tcatttttta tatgtcagag actgtcgaat ttctattgcg tttcaactaa ttacctcagt 120  
ttgttaaaac tgaatatgaa ttcc  
<210> 72  
<211> 113  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 72  
ntctatctag ttttatatga aganatcacg tatcacacga tggaccctaaa gaggtccaaa 60  
tatccacttg cagttctaca aaaagagtgt ttcacaacag cactatcaag agg  
<210> 73  
<211> 97  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 73  
tacattcttt ttcttaacta tccaccaoct cccctcaaaa ttttaacagc atccagcctc 60  
acaaaactca gatcttccct gtgtacagtt ccacttt  
<210> 62  
<211> 143  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 74  
gacaattcca ttcaatacca attgatgatg tttatttttg attccatttg atgatgatta 60  
cattcgattc catttcatca tgattccatt cgattccact cgatgattcc attcgattcc 120  
attcaatgat tattccactt gag  
<210> 75  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 75  
aatgataat atagtcaatt caggaaagan aatcatccta anatttcgta ttatgattag 60  
aagtgttaatt tcgctganat agaaaatttc tcattatt  
<210> 76  
<211> 88  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 76  
agctgacatt gtaatttaat aaagctaagg ataaaacttc tgggtttttt gtttattgag 60  
cccgtgact agaagagata agagatgg  
<210> 77  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 77



13/24

ctctggttgt tgtcagggtt ttnattatta gattccagaa ttcctgcagc ccgngggatc 60  
cactagtctt agagcggccg ccaccgcggt ggagctccag c  
<210> 78  
<211> 109  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 78  
aaggttacag tgagctatga tccaccactg cactccagca tgggcaacaa agcgagaccc 60  
agtatttaga tttatttgtt aatagccagg catattggta catgcgtgt  
<210> 79  
<211> 121  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 79  
ctatatcaca tactttattg tcttgtagag tttgctttgt ttcattgtgt gataccctga 60  
nttctgcag cccgggggat ccactagtgc tagagcggcc gccaccgcgg tggagctcca 120  
g  
<210> 80  
<211> 144  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 80  
ctatgagtgg cctccaagga gcattagatt agaagggtgc tggagggtgg atattttcat  
acacagagac aaagctcccc atcccacaac agatccagag tctgtnttgg accacaggga  
aggaaggccc ttctccagga ttct  
<210> 81  
<211> 160  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 81  
ttaggagagg tcagagtggg ctggagcagc caggtgagcc tttgttgtgt aggcaggagg 60  
aagaagcagt ggattttgag ttgaggacgg aatttgagag ggggagggaa aaggaaggga 120  
atccgcagag gcagagctga ctgcactcgt gagggagggg  
<210> 82  
<211> 164  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 82  
atacaaattg cagactgcag cgttctgaga aacatctttg tgatgtttgt attcaggaca 60  
gagagttgaa cattccctat catagagcag gttggaatca ctccttttgt agtatctgga 120  
agtggacatt tggagcgctt tcaggcctat gttggaaaag gaaa  
<210> 83  
<211> 164  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 83  
ttgtggttct agattttatg gtctcttttt tatttttcat tttttgagac caagtttcac 60  
tcttgttgcc cggtctggagt gcagtgcgc gatcttggct caccgcaacc tctgcctcca 120  
ggattcaagc gattcgctg cctcagcctt actgagtagc tccc  
  
<210> 84  
<211> 141  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

14/24

<400> 84  
tagttccagc tataccactt totagccttc ttgattttgc tgaactgaga gtcagaagag 60  
atatgtntct aggttatttc caatcattat gccatctcgg aagtggcagg ggtgctatac 120  
tagactgaga caaatacccc a  
<210> 85  
<211> 72  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 85  
cttctaaaat tctatggtag tatganaggc tacacaaaag tntttggacc tgatacaaat 60  
attataaatg at  
<210> 86  
<211> 135  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 86  
tcataaaaata accattaata tttcactttc gttttttatc ctaacctttt tctaacacat 60  
aaacatatct attgggaggt cgaggcgggc ggatcacgag gtaggagatc gacgaccatc 120  
cggtaaaagg tgaaa  
<210> 87  
<211> 107  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 87  
cagccccaag aatgtctgga gcccgagtat catctggcag ccaccctcgg agaagggggg 60  
gatccactag ttctagagcg gccgcaccgc ggtggagctc agctttt  
<210> 88  
<211> 109  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 88  
ccatgtggaa gcacagctat aaggctcttt ctatgaacca gaaagcaggc tttctctaaa 60  
caccgaatct gccaatgcct tgatcttgga tttccagat tccgaacta  
<210> 89  
<211> 112  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 89  
cagggactta atcaacgcaa gcttatgacc cgcacttact gggaattcct cgttcatggg 60  
gaataattgc aatccccgat ccccatcacg aatgggggttc aacgggttac cc  
<210> 90  
<211> 125  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 90  
acctgtaatc ccaactactc tggaggctga ggcaggagaa tggcatgaac ccgggaggtg 60  
gaggatgcag tgagccaaga ttgtgccact gaactctagc ccaggcaaag gtgagagact 120  
tgatc  
<210> 91  
<211> 130  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 91  
cacttaagat tgtatctttn actctatgag ttattttctca ataaaaagta aaatnnannn 60  
tactaataat taganatnat cttctctaga atgagcattn aatgagtcag ctagagaggc 120

15/24

gacttaactg  
<210> 92  
<211> 104  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 92  
cagcccttac attgtgtctg tgacccagtg ttaaagaga cccaggtcaa gagacaactc 60  
tttggctggc ctaggatatt ntataanata gatctatcac tctg  
<210> 93  
<211> 122  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 93  
cgtcagctca gcagcctgac aatttgaact cagtagtata acattgccac atggctatgt 60  
tcaggggtta atacttctta gcaaagaaat agagaccaat ctctgtgatc actttaaact 120  
tt

<210> 94  
<211> 76  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 94  
cacatggatg gggaggcctt ccaatcatgg cagaaggcaa aggagaaagn nagcacatct 60  
tacaggcagc aggcaa  
<210> 95  
<211> 109  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 95  
cagccccagc atggcaggaa tatntntngc attgggttct ttggaggagg aaagtacgtn 60  
ctcagagnag gcaatttntc gccgctggtt taaggctttn natgaccga  
<210> 96  
<211> 112  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 96  
cagccccgaa ttatgtatta anagttatcc tcaccaagaa agacaagggt tctgtagttc 60  
tctaacaatca tatccctata tanntntnac tgtgcagtat ccagacaatg acactccttc 120  
agagagaatt ctatggccac atctctaa  
<210> 97  
<211> 122  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 97  
taaaactttg ttataagaga tggaagggtt taaatatata nntctaannn nttntagttt 60  
aaagaattcc aaacttaaac atcttcagta gacttgacat tgtatttcgn atatcctatg 120  
tc

<210> 98  
<211> 88  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 98  
ctttaaattt ataaactcca aggcagtaca agtctggnnn nnnnnnagct acccaatatc 60  
tgataaatat gaatacctaa taatagac

16/24

<210> 99  
 <211> 105  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 99  
 tcctaaaact ctccctcacc agcatcccaa tttaaagcct tggtccttgc tctccctct 60  
 agggggatcc actagttcta gagcggccgc caccgcggtg gagct  
 <210> 100  
 <211> 86  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 100  
 cgccactatg ctgagctact tnnntntgt tttgtagaga tgggtgtttc accatgttgc 60  
 ccagactgat cttanactcc tgggtc  
 <210> 101  
 <211> 156  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 101  
 gaccctccac tgatttncca tottgaccac tgcctaccca attactgtnc cagtcgaaac 60  
 ctgggcgcga tgtgacgact ctctccctct ctacagctac acaaccgccg tgtgctgtcg 120  
 ggtcttatcc tttccacca gtccatggct tggctt  
 <210> 102  
 <211> 173  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 102  
 cagccccata aaattaacca tcacactagg tgatgttttt nttttttgag agcaagtctt 60  
 gctcgtcacc aggctggaat actgtggtgg gatctcagct cactgcacct ccacctctg 120  
 ggttccagca attgttctgc ctgagcctgg gggatccact agttctagag cgg  
 <210> 103  
 <211> 191  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 103  
 cagccccctt agaaatagct cttcgagaca ctcttggtag acatgatccc aggettgtctg 60  
 agcagctgtg caaccatgcc tcaggcctga ggaacagctc gcaggccact ctgtctggta 120  
 ataccccagg ccggccaagc aatagatctg catcccaggg ggatccacta gttctagagc 180  
 ggccgccacc g  
 <210> 104  
 <211> 191  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 104  
 bagccccctt ggctcagtct ggaaaggcaa gacaactaga aggtgggggg cttccagggc 60  
 ataggtagat tcanaaatgt actgattggc acttcottga ccgagttatt aactaaagac 120  
 ctggaatcaa tagaaaggaa tgtctgggtt aaggtaaggg ctatggggga tccactagtt 180  
 ctagacggcc g  
 <210> 105  
 <211> 103  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 105  
 ttctnagana tttnacatca nattaaccca ctganaaact tgcnaactct cactttcaac 60  
 gtctgancgg naatttttaat tggnggatcc actagttcta gag

17/24

<210> 106  
 <211> 173  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 106  
 cagccccctt attaactcac cccttgcat tgttcaaccc tagntaataa agtcactcag 60  
 gtgtacttct ganaattgaa gttaaattatt tttcaccaca gagctgaacc attacagagg 120  
 <210> 107  
 <211> 111  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 107  
 tcataanata accattaata tnnnnntnnn nnnnnnatcc taacattttt ctaacacata 60  
 aacatattca ctggggaggc cgaggcgggc ggatcacgag gtcaggagat c  
 <210> 108  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 108  
 caatttacac tctggcaggg ggaganagga naatttntnc tgtnggaagg gggagttgng 60  
 gnaggaggcc  
 <210> 109  
 <211> 104  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 109  
 caaanactaa natacctctn agtctggnta gacactttca ctggataggt agaggccttt 60  
 nctacaggnt atnanaaggc caccacagtc atttnttccc ttct  
 <210> 110  
 <211> 68  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 110  
 tcatgtaggc ctnttcacga ttttnnaaat catttnagtn acatccaagt nnnntngct  
 gttaatca  
 <210> 111  
 <211> 107  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 111  
 cagccccaat caagggtgt ttttcaatct ctttgtataa aannotagat tctgtattag 60  
 tctgtttctca ggctgctaataa aaagacatac ccaaggctgc gtacttt  
 <210> 112  
 <211> 173  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 112  
 tggaagaaa aactatgtac atctgagacg ctgcagctgg taccctactt ctttcagagc 60  
 atcaacagggt taagtgtgga ttcattccaca cctcagacc cgtgaccgta g  
 <210> 113  
 <211> 121  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 113  
 gaatctctac accaaccctc tcttaacctc tacagttcaa atccaaatct caaactttct 60

18/24

gatttgaatt tgcttatccc tatgtaattc taacttaaga cctaagacca aaagggaatc 120  
c  
<210> 114  
<211> 103  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 114  
tcttccagct aaatagttgc agagtcagag tagaagccag ctctcctgac aatatatttn  
atgatattct agagaatatc cctagaatca ttcctaggta ctc  
<210> 115  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 115  
tgctcattggt aatttatgtg agaacacaaa gcatccaaca ntanntgatt ctgcatttcg 60  
accaacagat agtttctcat cgaaga  
<210> 116  
<211> 120  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 116  
cagccccgtt tgttttacct ttngcttttn atgtgcttct ctaacanttn agggcgaact 60  
aaccagcatg aggnntgtnt ctgcttgatt ttnaaccatc ctttcctgtc tgtacacagg 120  
<210> 117  
<211> 95  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 117  
ccctccctga gtctntntaa cagcagcaat gccccaaaac ctnanttggt tcccctgata 60  
gccaggtacc cggnttctnt ngcagtgcta actgt  
<210> 118  
<211> 109  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 118  
tattaannnn nctaatactna atattntngt ntctcgggga acagaaaago ctgaggagaa 60  
ggagagatag tnggaatntc tagtnttgg agcagtcaga acacacata  
<210> 119  
<211> 79  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 119  
cctgtattac agaaccaagg attaaaaact cagcagatgt gtaatgagtt ttaaataatt 60  
acaatatnnn nnntataaa  
<210> 120  
<211> 83  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 120  
tagttgatcc gnnagcccat gcgataccgc gnnngcgctc gnnngccgang ggggatccac 60  
tagttctaga gcggccgcca ccg  
<210> 121  
<211> 177  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

19/24

<400> 121  
 cgtttggttt accttttcaact tttaaatgtgc tttctctaac aattaagggc gaactaacca 60  
 gcatgaggat tgtgtctgct tgatttttaaa ccacccctta atgtctgtac acaggaaatg 120  
 ttatcaacaa gagatgatcc ttgggggatc cactaggttc tagagcggcc gccaccg  
 <210> 122  
 <211> 103  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 122  
 ttatagttaa anacanagat ggtaacagcc ctttcccaaa gcagacctcc ttcttgccctg 60  
 gnaaagggct gttaccatct ttgttttaaa ctataaacta taa  
 <210> 123  
 <211> 139  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 123  
 caagaagggt ggtgctggca ttttcttctg gtgagggcct caggaagctt tcaatcatgg 60  
 cagaaagtga gaggagagta ggcattgtac anagagagac atgccttcat tctcggggga 120  
 tccactagtt ctagagcgg  
 <210> 124  
 <211> 103  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 124  
 cattaaagcc tttnttagga aatctnttta aacaacagaa taaaagggtat gacttttnaga 60  
 tagaactttt ngtgacatct ccagtttctg gttacatgat att  
 <210> 125  
 <211> 103  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 125  
 cagagagaga gaaacanaca gncagagaga gagagaccac anagagagag agagagagaa 60  
 gatcagacag agaaaganag agacagagac agacannnag aca  
 <210> 126  
 <211> 113  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 126  
 cagccccaga gagagagaaa cagacaggna gagagagaga gacacagaga gagagagaga 60  
 gagaagatca gacagagaaa gagagagaca gagacagaca nanagaatag aga  
 <210> 127  
 <211> 181  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 127  
 actcatttta tgaggccaga atcatcctga taccaaaacc tggcagagac acacacacac 60  
 aaaagaaaat ttcaggccaa tatccctgat aaacattgat gcaaaaatcc tcaataaaat 120  
 actggcaaac tgaatccagt agcacatcaa aaagctgggg gatccactag ttctagagcg 180  
 g  
 <210> 128  
 <211> 150  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 128

20/24

cccgcccat gtagctctca ggtggcccat gacaccacac tgttcttcct tcctctccat 60  
 ggttcacacc ggccacctag tcagtcctaa cgtcggaaacc tggatacctc cattgctggt 120  
 gctggaccg tcaactgttt ggatatttc

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 173

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 129

tcctaagtgt cccaacagtg gagcacatta ttcaggaact taaagatata atcgcagaac 60  
 agcaoctcca agctcgtaaa tgcttatctc ggtaaccctc agtcattgga caatcaaatt 120  
 caatacatcg gaggaacacc atgctgacgg gggatccact agttctagag cgg

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 187

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 130

ctatagaagc tccttctata ttngccttat nncactcatg gcggtagtft gaattcagat 60  
 ctctgggtca tttattatcc atggaaagtt aatttgagat gttggaactt ttaaacagtg 120  
 tttgtttatt gtgctaataca cgatctgtta cttaaatttga ttgggggatc cactagttct 180  
 agagcgg

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 170

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 131

cagatatttg tagatatgcc gcgttatttc tgagggctct gttctgttcc attgatctat 60  
 atctctgtct ttggtaccag taccatgctg ttttggttac tgtagccttg tagtatagtt 120  
 tgaagtcagg tagcatgatg cctccggggg atccactagt tctagagcgg

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 147

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 132

tctctaaaat tctatggtag ttgaaaggct acacaaaagt ttttggacct gatacaaata 60  
 ttataaatnn nnnnnnnnt gtntgatttg atactccatg taaaactctt cctaattggc 120  
 tcgggggatc cactagttct agagcgg

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 133

tattaaaaat acaaaaaatt agccgggagt ggtggcacgc gcctgtagtc ccagctactc 60  
 gggaggctat ggcaggaaaa tcccttgaac ctgggaggcg gaagttgcag cgagaagaga 120  
 tca

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 164

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 134

ctgtctttca agtttcaggc ttgaaagtga aaaataatgc ataatttacg gaagctattg 60  
 gtgtgaaaat atccaagaga agaattgagga atagtggagt gaaataaaca ggagattagg 120  
 tagatagaaa ttgactattg ggggatccac tagttctaga gcgg

&lt;210&gt; 135



21/24

&lt;211&gt; 193

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 135

cttaatatgg tatgcttaat gtagtgagct aaacaaaaata acaatgtgta tagtattgtn 60  
taanataccc cacttccaat tgtttaaaagt gcaaaacaaa ttatatgttt ganagttaag 120  
gtggaataaa tgaagattaa atgatatgaa ctactcagaa aacaggtagg gggatccact 180  
agttctagag cgg

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 136

cattgattaa atttattgat gcattgtaaa tttgaatcaa tatctattaa tcccaagctg 60  
gagtgcagtg gcgccatctc agctcactgc gacctctgcc tcccgggttc aagcaattct 120  
catacctcag cctcccgagt agctggaacc acaggcatga gccaccatgc ccggctagtt 180  
acagggtttt cctatgctat ccaggctgga gtgcagtgagg ggcaccacta gtt

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 194

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 137

ctaaaggatc cttcaactct gtgagttgaa tacacacaac acaaggaagt tactgagaat 60  
tattctgtct agcataatat gaagaaatcc cgtttccaac tgaagacctc aaagaggctg 120  
aatatccact tgcagacttt acagagtgtt tcctaactgc tctatgagag ggggatccac 180  
tagttctaga gcgg

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 155

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 138

cagcccggaa aatatagggc aaattttttt attttgctgt ttggtgactc caccactttt 60  
gcaacagtac ttttggtgcc cattaaccaa attactttga tttctttgtg taaatattat 120  
gaagaccaga acccttttgag ggggatccac tagtt

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 200

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 139

ctagacaaaa gcccatcac ctggatgaat cagtgcagag ttacgtcaca aagtcctttt 60  
aggcagatcc tagacaaggg ttacatcaact tggatgatca gtgcagagat atgtcacaat 120  
gccactgtag ggtgagccta gaaaagagtt tcatgacctc ggtgatcagt gcagaggggg 180  
atccactagt tctagagcgg

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 169

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 140

ctgtgactgt gcctatagaa gaaaaaaaaa atagcgtgta atctcagcac tctgggaggg 60  
caaagcaggg gggatcactt gagggcaaga gttcaagacc agcctggcca acaaaagcgaa 120  
accttctctc tactaaaaat acaaaaatta gccgggcatg gtggcactc

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 211

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

22/24

&lt;400&gt; 141

agggccacca gctggtgaat cctgccccac cagctcagag ctcttcccat tcatggagta 60  
 tatcatagga gactggattt ccaaagctgc atggagcttc attcctgaac tggtcaccct 120  
 gtgtctagtc ttgttttctc aatccatcct gctctccagc agcctcaata cttctaaaaa 180  
 tgtccggggg atccactagt tctagaggcg g

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 195

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 142

cacagacatc ctgtgccacc tcattcactc tcacatgcct ctgaggtgag ggggataaca 60  
 gcactagtat catttgatac tgatacaaat cggctctaaa tattgtgggg atgctggtgg 120  
 tgttattgct ggactccatt acacaagttt catgagccag tgaaaatcac tgtgggggat 180  
 ccactagttc tagag

&lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 199

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 143

Cagccctaaa gtataataaa aaaaaatttt ttaaagaatc ttcacaaaag aactctgaaa 60  
 tgtcagcatg agcagatgat gaagtatcat aggaatccat ttttgctgt atttcttatt 120  
 taatagagaa agaaatttca tatgctgtaa tatgtttcca attggaaatt aaaatctgat 180  
 aggggggatc cactagttc

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 178

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 144

cagccccct gtaacaatat gggctgttct agctgtaatt cacctctgga gccatcagaa 60  
 tcctcctggt aaaaatggcc ctaatatcaa acacagaggc cactgctagt taaactttat 120  
 aaatcgaaca agaaatcata tgatataatc agataagagc ctgggggatc cactagtt

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 158

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 145

cagccccctg ggctcaagca atctgcccac ctgggcctcc ccaagtgctg ggattacagg 60  
 tgtgagtnac tgncccggc cagccttgct tatttgctag aaacagggag ttggggcaac 120  
 cctggtgcc agatatgggg gggatccact agttctag

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 184

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 146

cagcccctgc taaataactt tcgaagttaa gaaagctaatt ggtatatcat caggcaccaa 60  
 taaaactatc ttgagatttg acaatgccaa ctgaaaaatt tcttctgcaa ggcagagcca 120  
 gttacctttt ataatatcaa tttagattca cacaaagaca ttctcagggg gatccactag 180  
 ttct

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 147

cagccccacg ggtggtaatc ntggctgctt tntgcacttc cacataaagt gcttctncta 60  
 cgctgtctcc actcagaaac aattacaaca gtatgtgaag cagtattgaa aacttcnnaa 120

23/24

gctgcacaca gattcattga aaagggcaga agcctcatta atactagagt ctgaggcaca 180  
acctatgacc gaacactggg ggggatccac tagttctag

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 185

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 148

cagcccccag aaaaaaaga gcaagaggat ggggctgaaa aaattactca aagaaataat 60  
ggctaaaaag tactcagggt tatcaaaaaga caagtctgca gaactaagaa gatgacaaaa 120  
tccttgtcat agacagaatg tgtgtttccc aaacttcgtg tgttgggggg atccactagt 180  
tctag

&lt;210&gt; 149

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 149

cagccctgca gtatttagtt ttctattcct gagttagttc acttaggaaa atgggtctcta 60  
gtcccatcca tgaagcacca aatccctcca gcccagtagc aaggagacag aatTTTTtact 120  
ctgtctctg

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 150

cagccctctt tttctgctcc taaggaagat gcattctcag gatacaggan nnnngggggga 60  
tccactagtt catg

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 95

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 151

cagccccatt taacctggag aggaataccc taaggattct tggaggctga aagacttaaa 60  
atttgaggaa tgaaagaata gcaagggtga atcgg

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 144

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 152

cagccctgca gtatttagtt ttctattcct gagttagttc acttaggaaa atgggtctcta 60  
gtcccatcca tgaagcacca aatccctcca gcccagtagc aaggagacag aatTTTTtact 120  
ctgtctctga tgagaagagt gtac

&lt;210&gt; 153

&lt;211&gt; 138

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 153

cagccctgat agttacctta ctgttttgct atgaccatac tctacataga gtatttagat 60  
taaattggagg aatgagaata tgagattagt ttctcatatt cttgtgatca tgacaggacc 120  
tgagattctg cacagatg

&lt;210&gt; 154

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

24/24

&lt;400&gt; 154

cagccccgct gtttctaaag tcagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgagag 60  
agagagagag agagagagcg tatgcatgtg tgtctgcatg tgtgtgtgcg cgcgtacatt 120  
tgggagacgg tgtgtaagt

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 155

cagccccggaa aggtaataca agtaagatga ttataaaca atgcttttaa acagagtcaa 60  
tgaaaccagt ctgtttgtga ggccaaggc tccatatatt acaactcagt ctgtaaggat 120  
agctatgtat ctg

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2003/000304

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, G01N 33/68, A61P 35/00,31/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, A61B 5/145, A61P 35/00,31/00, G01N 33/569,33/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	RU 2207876 C1 (TKACHENKO VITALY VASILIEVICH) 10.07.2003, page 4, paragraphs 3-4, page 5, paragraphs 2,4,5, page 6, paragraphs 1,2,4, page 8, paragraphs 7-8, pages 9,17, paragraph 1 at the bottom, page 22, example 17	1-10,12,13,19,20		
Y		14-18		
X	US 6521409 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 18.02.2003, page 16, paragraphs 4,6, page 17, paragraphs 1,7,9, page 18, paragraphs 1-3,13, page 25, paragraphs 6-10, page 26, paragraph 1, page 32, paragraphs 2-3, page 33, paragraph 2	1-10,11,19,21		
Y		22		
Y	FAVOROV PETR VLADIMIROVICH, Issledovanie kinetiki prevraschany DNK pod deystviem DNK-topoizomeraz I DNK-abzimov, Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoi stepeni kandidata biologicheskikh nauk, M., 1999, pages 3-4	16		
Y	NIKOLENKO GALINA NIKOLAEVNA, Sozдание rekombinantnykh antitel protiv virusa kleschevogo entsefalita I izuchenie ikh svoystv, Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoi stepeni kandidata biologicheskikh nauk, Koltsovo, 1999, pages 1-2, 19	17		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;">           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 March 2004 (19.03.2004)</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25 March 2004 (25.03.2004)</div>		
Name and mailing address of the ISA/ <div style="text-align: center; font-weight: bold;">RU</div>		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YASEROVA NATALIYA EVGENIEVNA, Razrabotka I izuchenie diagnosticheskikh vozmozhnostei immunofermentnykh test-sistem na osnove antigennykh preparatov zolotistogo stafilokokka I DNK , Avtoreferat dissertatsii na soiskanie uchenoi stepeni kandidata meditsinskikh nauk, M., 1988, pages 17-18	22
Y	US 6428785 (IMMUNOLYTICS INC.) 06.08.2002, the abstract, pages 10,14, paragraphs 7-13, page, 15, paragraphs 1-5, page 30, paragraphs 3-4	14,15,18
A	KRAPF F. et al., The estimation of circulating immune complexes, C3d, and anti-ds-DNA-antibody serum levels in the monitoring of therapeutic plasmapheresis in a patient with systemic lupus erythematosus. A case report, Clin Exp Rheumatol. 1985 Apr-Jun; 3(2):159-62, abstr. PubMed, the abstract	1-10,19,20
A	RAZ E. et al., Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney, J Immunol. 1989 May 1; 142(9):3076-82, abstr. PubMed, the abstract	1-10,19,20
A	US 5889153 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) 30.03.1999	14,15,18

# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №  
PCT/RU 2003/000304

<b>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:</b> A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, G01N 33/68, A61P 35/00,31/00 Согласно международной патентной классификации (МПК-7)		
<b>В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:</b> Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7: A61K 38/43,31/7088,39/395, A61M 1/36, A61B 5/145, A61P 35/00,31/00, G01N 33/569,33/68		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):		
<b>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</b>		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	RU 2207876 C1 (ТКАЧЕНКО ВИТАЛИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ) 10.07.2003, с.4, абзацы 3-4, с.5, абзацы 2,4,5, с.6, абзацы 1,2,4, с.8, абзацы 7-8, с.9,17, абзац 1 снизу, с.22, пример 17	1-10,12,13,19,20
Y		14-18
X	US 6521409 (THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION) 18.02.2003, с.16, абзацы 4,6, с.17, абзацы 1,7,9, с.18, абзацы 1-3,13, с.25, абзацы 6-10, с.26, абзац 1, с.32, абзацы 2-3, с.33, абзац 2	1-10,11,19,21
Y		22
Y	ФАВОРОВ ПЕТР ВЛАДИМИРОВИЧ, Исследование кинетики превращений ДНК под действием ДНК-топоизомераз и ДНК-абзимов, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата баологических наук, М., 1999, с. 3-4	16
Y	НИКОЛЕНКО ГАЛИНА НИКОЛАЕВНА, Создание рекомбинантных антител против вируса клещевого энцефалита и изучение их свойств, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Кольцово, 1999, с. 1-2,19	17
X последующие документы указаны в продолжении графы С.		
* Особые категории ссылочных документов: А документ, определяющий общий уровень техники Е более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее О документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д. Т более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории & документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска: 19 марта 2004 (19.03.2004)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 25 марта 2004 (25.03.2004)
Наименование и адрес Международного поискового органа Федеральный институт промышленной собственности РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30.1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо: И. Катыхова Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)

# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №  
PCT/RU 2003/000304

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ЯСРЕБОВА НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА, Разработка и изучение диагностических возможностей иммуноферментных тест-систем на основе антигенных препаратов золотистого стафилококка и ДНК, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, М., 1988, с. 17-18	22
Y	US 6428785 (IMMUNOLYTICS INC.) 06.08.2002, реферат, с.10,14, абзацы 7-13, с.15, абзацы 1-5, с.30, абзацы 3-4	14,15,18
A	KRAPF F. et al., The estimation of circulating immune complexes, C3d, and anti-ds-DNA-antibody serum levels in the monitoring of therapeutic plasmapheresis in a patient with systemic lupus erythematosus. A case report, Clin Exp Rheumatol. 1985 Apr-Jun; 3(2):159-62, abstr. PubMed, реферат	1-10,19,20
A	RAZ E. et al., Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney, J Immunol. 1989 May 1; 142(9):3076-82, abstr. PubMed, реферат	1-10,19,20
A	US 5889153 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) 30.03.1999	14,15,18